

**PEMBERIAN MAGGOT (*Hermetia illucens* larvae) TERHADAP TINGKAT  
INTENSITAS GEN TNF- $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$  PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG  
TERPAPAR BAKTERI *Aeromonas salmonicida***

**TESIS**

Oleh:

**TRI SEPTIANA**

**NIM. 206080117111006**



**PROGRAM MAGISTER BUDIDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2021**

**PEMBERIAN MAGGOT (*Hermetia illucens* larvae) TERHADAP TINGKAT  
INTENSITAS GEN TNF- $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$  PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG  
TERPAPAR BAKTERI *Aeromonas salmonicida***

**TESIS**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Magister Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya

Oleh:

**TRI SEPTIANA**

**NIM. 206080117111006**



**PROGRAM MAGISTER BUDIDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG  
2021**



TESIS

PEMBERIAN MAGGOT (*Hermetia illucens larvae*) TERHADAP TINGKAT  
INTENSITAS GEN TNF- $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$  PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG  
TERPAPAR BAKTERI *Aeromonas salmonicida*

Oleh:

TRI SEPTIANA  
NIM. 206080117111006

Telah dipertahankan di depan penguji  
Pada tanggal 30 Juli 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui:  
Komisi Pembimbing,

Ketua



(Prof. Dr. Ir. Maftuch, M. Si)  
NIP. 19660825 199203 1 001

Tanggal: 8/22/2021

Anggota



(Dr. Uun Yanuhar, S. Pi, M. Si)  
NIP. 19730404 200212 2 001

Tanggal: 8/21/2021

Mengetahui,



Dekan  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

(Prof. Dr. Ir. Maftuch, M. Si)  
NIP. 19660825 199203 1 001

Tanggal: 8/22/2021

Ketua  
Program Magister



(Dr. Ir. M. Firdaus, MP.)  
NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal: 8/21/2021

# JUDUL TESIS:

**PEMBERIAN MAGGOT (*Hermetia illucens* larvae) TERHADAP TINGKAT INTENSITAS GEN TNF- $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$  PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG TERPAPAR BAKTERI *Aeromonas salmonicida***

**Nama Mahasiswa** : Tri Septiana

**NIM** : 206080117111006

**Program Studi** : Budidaya Perairan

**Minat Ilmu Studi** : Penyakit dan Kesehatan Ikan

## KOMISI PEMBIMBING

**Ketua** : Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si

**Anggota** : Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si

## KOMISI PENGUJI

**Dosen Penguji I** : Dr. Ir. Muhamad Fadjar, M.Sc

**Dosen Penguji II** : Rahmi nurdiani, S.Pi., M.App.Sc., Ph.D

**Tanggal Ujian Tesis** : 30 Juli 2021



## RIWAYAT HIDUP



**Tri Septiana**, Lahir di Sumenep pada tanggal

12 September 1998 merupakan anak ketiga

dari empat bersaudara, dari ayah Sahari dan

Ibu Sadi'a. Penulis menempuh pendidikan

dasar di SDN Kalianget Timur 4 pada tahun

2004-2010. Menempuh sekolah menengah

pertama di SMPN 1 Kalianget pada tahun

2010-2013. Selama menempuh pendidikan

pada jenjang SMP, penulis pernah mengikuti

Olimpiade Olahraga Sains Nasional (O2SN)

Karate tingkat Kabupaten bahkan Nasional. Selain itu, penulis juga mengikuti

Olimpiade Sains Nasional (OSN) Matematika sejak SMP hingga SMA tingkat

Kabupaten. Dan pada jenjang sekolah menengah atas menempuh pendidikan di

SMAN 1 Sumenep pada tahun 2013-2016. Penulis menempuh Pendidikan Strata

1 di Program Studi Budidaya Perairan (BP), Jurusan Manajemen Sumberdaya

Perairan (MSP), Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya,

Malang pada tahun 2016-2020. Selama menempuh studi S1 penulis aktif

mengikuti organisasi mahasiswa non-akademis yaitu menjadi Penanggung Jawab

(PJ) Buntal bidang Badminton, PJ Titik Ruang HMPBP bidang Seni dan Lukis,

Bendahara Adventura dan aktif mengikuti kegiatan kepanitiaan bidang perikanan,

salah satunya menjadi volunteer panitia di *International Betta Cup* 2018. Kemudian,

penulis melanjutkan pendidikan menempuh Program Magister (S2) di Program

Magister Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas

Brawijaya, Malang jalur Fasttrack dengan konsentrasi pada bidang Penyakit dan

Kesehatan Ikan pada tahun 2019-2021.



## UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah swt atas terlaksananya proses kuliah serta serangkaian kegiatan penelitian dan penyusunan tesis yang berjudul : **Pemberian Maggot (*Hermatia illucens larvae*) Terhadap Tingkat Intensitas Gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang**

**Terpapar Bakteri *Aeromonas salmonicida*** maka penulis menghaturkan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Orang tua dari penulis, Bapak Sahari, Ibu Sadi'a, Mama Sufiyati, Ayah Didik Suryadi serta tunanganku Angga Surya Prayogo yang telah memberikan doa, motivasi dan dukungan selama ini.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si dan Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si selaku pembimbing yang telah memberi arahan dan bimbingan sehingga Tesis ini terselesaikan dengan baik.
3. Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc dan ibu Rahmi nurdiani, S.Pi., M.App.Sc., Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberikan arahan dalam menyelesaikan Laporan Tesis ini dengan baik.
4. Keluarga dari Penulis yang telah memberikan doa, motivasi dan dukungan selama ini.
5. Mas Andhang dan MbK Febi selaku Senior yang membantu jalannya penelitian berlangsung.
6. Teman Satu Tim Penelitian Mas Hengky, MbK Dayu dan Masitah yang telah berkerja sama serta selalu memberikan dorongan untuk menyelesaikan Tesis ini.
7. Teman-teman seperjuangan Fastrack yang telah memberikan doa, semangat dan dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan laporan Tesis ini.
8. Teman-teman Magister FPIK-UB yang terus memberikan semangat kepada penulis selama ini.
9. Semua pihak yang sudah membantu sehingga Tesis ini bisa selesai dengan baik.



## RINGKASAN

**TRI SEPTIANA.** Pemberian Maggot (*Hermatia illucens larvae*) Terhadap Tingkat Intensitas Gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang terpapar bakteri *Aeromonas salmonicida* (dibawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si dan Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si)

---

Ikan hias koi (*C. carpio*) sebagai salah satu ikan yang banyak diminati karena keindahan bentuk badan serta warnanya, dan dipercaya membawa keuntungan oleh para pecinta koi di Indonesia. Meningkatnya budidaya ikan koi (*C. carpio*) tidak menjamin keberhasilan dalam budidaya menghasilkan daya jual yang tinggi. Salah satu penyakit yang sering menyerang ikan koi yaitu *Aeromonas salmonicida*. *Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri penyebab furunculosis pada ikan yang dapat mengakibatkan kerugian ekonomi di dalam budidaya ikan air tawar. Ada indikasi bahwa jenis ikan non-salmonid yang hidup di lingkungan tawar, payau maupun laut sangat rentan terhadap serangan bakteri ini.

Penggunaan antibakteri banyak digunakan oleh para pembudidaya dan dianggap sebagai solusi yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. salmonicida*, namun jika penggunaannya berkepanjangan dapat mengakibatkan bertambahnya jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik, menyebabkan residu dan dapat mencemari lingkungan. Sehingga membutuhkan alternatif lain untuk mengatasi permasalahan tersebut, Metode yang dapat meningkatkan kekebalan tubuh ikan terhadap penyakit, lebih murah, ramah lingkungan dan tidak menyebabkan resisten terhadap bakteri. Salah satunya yaitu dengan menggunakan imunostimulan. Bahan alami yang dapat digunakan untuk meningkatkan respon imun ikan dan ramah lingkungan adalah maggot.

Maggot digunakan sebagai sumber nutrisi yang sangat baik karena mengandung protein yang tinggi, lipid dan mineral. Nilai nutrisi maggot pada umur 6-7 hari yaitu protein 60,2%, Lemak 13,3%, Abu 7,7% dan Karbohidrat 18,8%. Maggot sebagai larva dari lalat *black soldier* memiliki kandungan peptida yang melimpah dan beragam yang berpotensi sebagai antimikroba. *Antimicrobial peptides* (Peptida antimikroba) adalah salah satu senyawa yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai alternatif antibiotik untuk mengatasi masalah resistensi bakteri akibat penggunaan antibiotik konvensional.

Setiap adanya infeksi mikroorganisme baik bakteri, virus dan parasit ataupun jamur ke dalam tubuh, maka ikan akan memberikan respons dengan sistem pertahanan tubuh. Telah diketahui ikan lebih mengandalkan mekanisme sistem kekebalan non-spesifiknya, seperti gen sitokin. Sitokin dapat diproduksi oleh hampir setiap jenis sel yang berinti dalam menanggapi rangsangan yang merugikan. Sebagian besar, sitokin diproduksi dan bertindak secara lokal. Sitokin menekan aktivitas anti-inflamasi yang buruk dan memproduksi sinyal pro-inflamasi untuk membatasi peradangan jaringan dan kerusakan inang, serta menginduksi inflamasi akibat infeksi atau cedera. Gen sitokin pro-inflamasi adalah TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Tujuan penelitian ini untuk mengetahui seberapa besar pemberian maggot jika dijadikan sebagai imunostimulan pada ikan Koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* terhadap tingkat intensitas gen sitokin pro-inflamasi TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .



Hasil perbandingan Intensitas (%) gen sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  setiap perlakuan pada organ lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* menunjukkan bahwa ikan sehat ataupun ikan yang terinfeksi bakteri tanpa perlakuan memiliki tingkat intensitas gen yang lebih rendah jika dibandingkan dengan ikan perlakuan pakan maggot. Pada lambung ikan sehat memiliki intensitas sebesar 29,31%, pada usus sebesar 27,29% untuk gen TNF- $\alpha$  dan untuk gen IL-1 $\beta$  memiliki rata-rata intensitas sebesar 25,09% pada organ lambung dan 24,53% pada usus. Jika, dibandingkan dengan tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  pada ikan sakit atau ikan kontrol positif terpapar bakteri *A. salmonicida* tanpa pemberian pakan maggot, intensitas TNF- $\alpha$  pada organ lambung memiliki tingkat intensitas sebesar 28,35% dan pada organ usus sebesar 30,89%. Sedangkan, pada gen IL-1 $\beta$  mengalami peningkatan intensitas sebesar 30,32% pada lambung dan 27,3% pada usus ikan koi (*C. carpio*). Dan dari keempat perlakuan, perlakuan terbaik yang memiliki tingkat intensitas paling rendah adalah perlakuan B dengan dosisi 50% tepung maggot dan tepung ikan. Pada gen TNF- $\alpha$  yang hampir sama dikedua organ yang diamati yaitu sebesar 32,16% pada lambung dan 32,13% pada usus dan gen IL-1 $\beta$  pada organ lambung dan usus masing-masing sebesar 29,07% dan 28,09%. Ikan koi (*C. carpio*) pada perlakuan B merupakan dosis terbaik yang memiliki respon imun yang lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya, dikarenakan sistem imunitas dalam tubuh untuk melawan bakteri dalam kondisi baik.





## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Allah SWT berkat rahmat, karunia dan hidayat-Nya penulis dapat menyelesaikan Laporan Tesis ini dengan judul:

**“PEMBERIAN MAGGOT (*Hermetia illucens larvae*) TERHADAP TINGKAT INTENSITAS GEN TNF- $\alpha$  DAN IL-1 $\beta$  PADA IKAN KOI (*Cyprinus carpio*) YANG TERPAPAR BAKTERI *Aeromonas salmonicida*”**. Penulis juga berterima kasih

kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Maftuch, M.Si. dan Ibu Dr. Uun Yanuhar, S. Pi, M.Si selaku dosen pembimbing dan semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan tesis ini.

Penulis sangat berharap laporan tesis ini dapat berguna bagi pembaca dalam rangka menambah wawasan serta pengetahuan mengenai Pemberian Maggot (*Hermetia illucens larvae*) Terhadap Tingkat Intensitas Gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) yang terpapar bakteri *Aeromonas salmonicida*. Selain itu, penulis menyadari bahwa di dalam laporan tesis ini masih terdapat kekurangan dan jauh dari kata sempurna. Oleh sebab itu, penulis berharap adanya kritik serta saran demi perbaikan tulisan yang akan dibuat di masa yang akan datang. Demikian penulis sampaikan terima kasih.

Malang, Agustus 2021

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>TESIS.....</b>	<b>ii</b>
<b>JUDUL TESIS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RIWAYAT HIDUP.....</b>	<b>iv</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH.....</b>	<b>v</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiv</b>
<b>GLOSARIUM.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Ikan Koi ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	7
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	7
2.1.2 Habitat.....	8
2.1.3 Pakan dan Kebiasaan Makan.....	9
2.2 Penyakit Ikan.....	10
2.3 Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	11
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri.....	11
2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangan.....	11
2.3.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan Bakteri.....	12
2.4 Sistem Imun.....	13
2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik.....	15
2.5 Sitokin.....	17
2.5.1 <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF- $\alpha$ ).....	19
2.5.2 <i>Interleukin-1<math>\beta</math></i> (IL-1 $\beta$ ).....	20
2.6 Imunostimulan.....	21
2.7 Strategi Pemberian Imunostimulan.....	22
2.8 Maggot.....	22
2.8.1 Siklus Hidup.....	23



2.8.2 Habitat.....	24
2.8.3 Kandungan.....	25
2.9 Analisis Biologi Molekuler.....	26
2.9.1 Elektroforesis.....	26
2.9.2 <i>Real Time</i> PCR (Polymerase Chain Reaction).....	26
<b>3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....</b>	<b>29</b>
3.1 Landasan Teori.....	29
3.2 Kerangka Konsep Penelitian.....	30
3.3 Hipotesis.....	32
3.4 Kerangka Operasional Penelitian.....	32
3.5 Kebaharuan Penelitian.....	33
3.6 Strategi Publikasi.....	34
<b>4. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>36</b>
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	36
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	36
4.3 Metode Penelitian.....	37
4.4 Rancangan Percobaan.....	37
4.5 Prosedur Penelitian.....	38
4.5.1 Tahap 1.....	38
4.5.2 Tahap 2.....	41
4.6 Parameter Utama.....	43
4.6.1 Survival Rate.....	43
4.6.2 Analisis tingkat Integritas Gen.....	43
4.6.3 Deteksi Molekuler.....	46
4.7 Parameter Penunjang.....	47
<b>5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>48</b>
5.1. Uji Spektrofotometer <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR) Maggot.....	48
5.2. Uji <i>Lethal Concentration</i> 50% (LC <sub>50</sub> ).....	49
5.3. Tingkat Intensitas Gen.....	50
5.3.1. <i>Tumor Necrosis Factor alfa</i> (TNF- $\alpha$ ).....	52
5.3.2. <i>Interleukin-1<math>\beta</math></i> (IL-1 $\beta$ ).....	57
5.4. Survival Rate (SR).....	62
5.5. Kualitas Air.....	64
5.5.1. Suhu.....	64
5.5.2. Derajat Keasaman (pH).....	65
5.5.3. Oksigen Terlarut (DO).....	65

**6. PENUTUP.....67****6.1. Kesimpulan.....67****6.2. Saran.....67****DAFTAR PUSTAKA.....68****LAMPIRAN.....74**



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Jurnal Penelitian Terkait Pemanfaatan Maggot untuk Meningkatkan Respon Imun Non Spesifik Ikan Koi yang Diinfeksi Bakteri <i>A. salmonicida</i> .....	34
2. Primer Gen TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , $\beta$ -actin dan primer bakteri <i>A. salmonicida</i> .....	37
3. Berat Bahan Pakan Tiap Perlakuan per 500 gr.....	42
4. Hasil FT-IR Tepung Maggot.....	49
5. Hasil <i>Lethal Concentration 50%</i> (LC <sub>50</sub> ) Bakteri <i>A. salmonicida</i> .....	50
6. Hasil Nanodrop sampel organ Lambung dan Usus ikan Koi ( <i>C. carpio</i> ).....	51
7. Hasil Tingkat Intensitas Gen TNF- $\alpha$ pada ikan Koi ( <i>C. carpio</i> ).....	52
8. Hasil Tingkat Intensitas Gen IL-1 $\beta$ pada ikan Koi ( <i>C. carpio</i> ).....	57
9. <i>Survival Rate</i> Ikan Koi ( <i>C. carpio</i> ) Selama Penelitian.....	63



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Koi ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	7
2. Morfologi Ikan Koi ( <i>Cyprinus carpio</i> ).....	8
3. Bakteri <i>A. salmonicida</i> .....	11
4. Konsep Sistem Imun Pada Ikan.....	14
5. Mekanisme Respon Imun pada Ikan.....	16
6. Morfologi Larva Maggot.....	23
7. Siklus Hidup <i>H. illucens</i> .....	24
8. Fase PCR.....	28
9. Kerangka Konsep Penelitian.....	31
10. Kerangka Operasional Penelitian.....	33
11. Denah Perlakuan Penelitian.....	38
13. Hasil FT-IR Tepung Maggot.....	48
14. Rata-rata Hasil Tingkat Intensitas Gen TNF- $\alpha$ pada organ lambung dan usus ikan Koi ( <i>C. carpio</i> ).....	54
15. Hasil Rata-rata Intensitas (%) gen sitokin IL-1 $\beta$ pada ikan koi ( <i>C. carpio</i> ).....	60
16. Survival Rate Ikan Koi ( <i>C. carpio</i> ).....	63



## DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Halaman
1. Jadwal Penelitian	74
2. Sertifikat Bakteri <i>A. salmonicida</i>	75
3. Hasil Analisis Proksimat	77
4. Formulasi Pakan yang Digunakan	78
5. Hasil Uji Kemurnian dan Konsentrasi RNA	80
6. Hasil Uji Kemurnian dan Konsentrasi cDNA	81
7. Hasil Uji RT-qPCR Gen IL-1 $\beta$	82
8. Hasil Uji RT-qPCR Gen TNF- $\alpha$	83
9. Data SPSS Survival Rate (SR)	84



## GLOSARIUM

Angiogenesis	Proses fisiologi dimana pembuluh darah baru terbentuk dari pembuluh darah yang telah ada. Proses penting dalam pertumbuhan dan perkembangan, serta penyembuhan luka ataupun pembentukan jaringan yang rusak
Antibodi	Zat kimia yang ada di dalam tubuh, yang bekerja sebagai sistem imunitas tubuh. Antibodi berperan penting sebagai tembok pertahanan terhadap antigen yang menyebabkan penyakit
Antigen	Zat yang dapat merangsang sistem imunitas tubuh untuk menghasilkan antibodi sebagai perlawanan. Antigen berupa bakteri, virus, parasit atau bahan kimia tertentu. Antigen dianggap benda asing oleh sistem imun yang dapat mengancam kesehatan tubuh
$\beta$ -actin	Beta actin, sering digunakan sebagai loading kontrol, untuk menormalkan jumlah total protein dan memeriksa degradasi protein pada sampel. Transkripsinya digunakan sebagai standar gen Housekeeping di qPCR. Berat molekulnya kira-kira sebesar 42 kDa.
DNA	Deoxyribonucleat acid, polimerasi yang menyimpan informasi genetika organisme, dan disusun oleh nukleotida arginin (A), timin (T), sitosin (S) dan guanine (G)
Elektroforesis	Teknik memisahkan molekul sel berdasarkan massa dan bentuk molekul dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan
Furunkulosis	Iperadangan yang terjadi pada kulit berupa benjolan bernanah yang biasanya disebabkan oleh infeksi bakteri
Hipersensitivitas	Reaksi-reaksi dari sistem kekebalan tubuh yang terjadi ketika jaringan tubuh yang normal mengalami cedera/terluka
IL- $\beta$	Interlukin-1beta, sitokin pro-inflamasi yang diekspresikan oleh banyak sel termasuk makrofag, sel NK, monosit dan neutrofil
Imunitas adaptif	Secara sistematis diperantarai oleh limfosit dan dirangsang oleh adanya agen infeksius. Sistem imun ini ditandai dengan spesifitas tinggi dan memiliki memori yang berkemampuan dalam merespon agen infeksi yang sama secara berulang, lebih cepat dan berulang
Imunitas alami	Bentuk pertahanan dari agen infeksi dan bergantung pada mekanisme yang ada sebelum terjadinya infeksi, respon cepat serta bereaksi dengan cara yang sama pada semua ageam infeksi
Imunitas humor	Jenis respon imun adaptif dan diperantarai oleh antibodi yang diproduksi oleh sel B
Imunitas seluler	Jenis respon imun adaptif yang diperantari oleh limfosit T dan berperan penting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap agen infeksi seperti aktivasi fagosit diperantarai oleh sel CD4+
Inflamasi	Suatu reaksi kompleks jaringan terhadap infeksi yang melibatkan akumulasi protein plasma dan leukosit. Inflamasi berperan sebagai pelindung dalam mengendalikan infeksi dan meningkatkan perbaikan jaringan tubuh yang rusak, tetapi juga



	dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan penyakit
Komunikator	Pihak yang bertindak sebagai pengirim pesan kepada komunikan dalam proses komunikasi
Limfosit B	Sel yang mampu menghasilkan molekul antibodi sebagai mediator respon imun humoral. sel ini berkembang dalam sumsum tulang belakang, sel B matur dalam folikel limfoid dan jaringan limfoid sekunder serta sedikit dalam darah
Limfosit T	Komponen utama dalam respon imun seluler pada sistem imun adaptif yang mengekspresikan reseptor antigen mengenali fragmen peptida protein asing yang terikat pada molekul MHC
Makrofag	Sel fagosit mononuklear yang utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing lainnya. Makrofag diproduksi oleh sumsum tulang belakang dari sel induk mieloid yang mengalami proliferasi dan dilepaskan ke dalam darah
mRNA	Messenger RNA, RNA yang merupakan hasil transkripsi DNA dan yang akan menjadi perantara pembawa urutan protein dalam proses translasi
Neutrofil	Salah satu jenis sel darah putih yang ada di dalam tubuh. Peran neutrofil untuk membantu melawan infeksi, sekaligus melindungi dari serangan penyakit lainnya
PCR	Polymerase Chain Reaction, teknik amplifikasi DNA in vitro yang meniru fenomena replika DNA in vivo
Pirogen	Suatu produk mikroorganisme, terutama bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan gangguan fungsi tubuh. Pirogen dikelompokkan menjadi dua macam yaitu pirogen endogen dan pirogen eksogen. Pirogen endogen berasal dari dalam tubuh sebagai reaksi kekebalan yang melawan penyakit yang masuk ke tubuh. Sedangkan, pirogen eksogen berasal dari luar tubuh yang bersifat racun dan dapat menyebabkan penyakit
Primer	Sepasang DNA untai tunggal atau oligonukleotida rantai pendek yang menginisiasi gen DNA target
Proliferasi	Pertumbuhan dan penambahan sel yang sangat cepat dalam kondisi abnormal
Sel B	Sel limfosit yang berperan pada kekebalan humoral tubuh inang
Sel dendritik	Sel yang dihasilkan oleh sumsum tulang, terdapat pada jaringan epitel dan limfoid, secara morfologi ditandai dengan penonjolan membran tipis dan berperan sebagai APC untuk memulai respon terhadap antigen
Sel NK	Sel Natural killer, subset sel-sel limfoid yang berfungsi untuk membunuh sel yang terinfeksi mikroba melalui mekanisme lisis langsung dan sekresi IFN- $\gamma$ dalam respon alami
Sequencing	Teknik penentuan urutan basa nukleotida pada molekul DNA
Sitokin	Senyawa protein dengan berat molekul kira-kira 8-80kDa yang merupakan mediator larut fase efektor imun natural dan adaptif
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor, salah satu sitokin yang terlibat dalam patogenesis saat terjadinya inflamasi dan komunikasi antara sel



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ikan Koi (*C. carpio*) merupakan salah satu ikan yang memiliki banyak peminat karena keindahan bentuk tubuhnya serta variasi warnanya. Ikan ini juga dipercaya oleh para pecintanya akan membawa keberuntungan. Di Indonesia sendiri pemerintah melalui Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) membentuk beberapa daerah sentra budidaya komoditas koi terbesar di tanah air dengan konsep minapolitan. Beberapa daerah tersebut seperti Sukabumi, Cianjur, Jakarta Barat, Blitar, dan Makasar (Kusrini, *et al.*, 2015).

Meningkatnya budidaya ikan koi (*C. carpio*) tidak menjamin akan menghasilkan daya jual yang tinggi dan memenuhi kebutuhan pasar yang tinggi. Hal ini disebabkan timbulnya serangan penyakit selama proses budidaya (Setiawan, *et al.*, 2019). Timbulnya penyakit merupakan hasil interaksi yang tidak stabil antara lingkungan, ikan dan jasad/organisme penyakit. Bakteri merupakan salah satu organisme yang menyebabkan penyakit pada ikan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Haryani, *et al.* (2012) bahwa penyakit yang disebabkan terserang bakteri merupakan salah satu masalah yang sangat serius yang sering kali dihadapi oleh para pembudidaya ikan. Faktor terjadinya penyakit yang disebabkan bakteri dikarenakan adanya perubahan kondisi lingkungan, ikan stress, perubahan temperatur, air yang terkontaminasi dan ketika host (inang) telah terinfeksi oleh bakteri. Bakteri yang bersifat patogen oportunistik dapat mengakibatkan kematian massal pada ikan. Salah satu contoh bakteri yang bersifat oportunistik ialah bakteri dari genus *Aeromonas*.

*Aeromonas salmonicida* adalah salah satu spesies dari genus *Aeromonas* yang bersifat patogen dan sangat berbahaya pada budidaya intensif ikan jenis



salmonid. *Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri penyebab furunculosis pada ikan yang dapat mengakibatkan kerugian ekonomi di dalam budidaya ikan air tawar. Ada indikasi bahwa jenis ikan non-salmonid yang hidup di lingkungan tawar, payau maupun laut sangat rentan terhadap serangan bakteri ini, termasuk jenis ikan karper, lamprey, lele, pike, ikan putih, tinca-tinca, patin, mas koki dan spesies ikan laut antara lain seperti sable fish dan ikan sidat. Jenis ikan cyprinids, terutama ikan mas, dapat juga terinfeksi *A. salmonicida* (Priyatna, *et al.*, 2011).

Penggunaan antibakteri banyak digunakan oleh para pembudidaya dan dianggap sebagai solusi yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. salmonicida*, seperti *oxytetracycline*, *sulfonamide*, dan *sulfamerazine*. Penggunaan antibiotik tersebut awalnya menunjukkan hasil yang menggembirakan, akan tetapi jika penggunaannya berkepanjangan dapat mengakibatkan bertambahnya jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik, menyebabkan residu dan dapat mencemari lingkungan (Sumino, *et al.*, 2013). Menurut Wang, *et al.* (2015), penggunaan antibiotik, bahan kimia ataupun kemoterapi untuk profilaksis dan pengobatan dalam budidaya intensif banyak dikritik karena dampak negatifnya. Selain itu, harga antibiotik relatif mahal, sehingga diperlukan alternatif pengganti antibiotik.

Akibat dampak negatif penggunaan bahan kimia, kemoterapi dan antibiotik pemerintah mengeluarkan peraturan yang berisikan tentang larang penggunaan antibiotik. Untuk menghindari dampak negatif penggunaan antibiotik, kemoterapi dan bahan-bahan tersebut, banyak peneliti melakukan penelitian mengenai bahan-bahan alami berbagai metode yang berpotensi sebagai alternatif antibakteri. Metode yang dapat meningkatkan kekebalan tubuh ikan terhadap penyakit, lebih murah, ramah lingkungan dan tidak menyebabkan resisten terhadap bakteri. Salah satunya yaitu dengan menggunakan imunostimulan (Selvaraj, *et al.*, 2006).



Peningkatan kekebalan tubuh ikan bisa dilakukan dengan pemberian imunostimulan. Imunostimulan merupakan zat kimia, obat-obatan, stesor atau stimulus untuk meningkatkan respon imun ikan yang berinteraksi secara langsung dengan sel imun (Suhermanto, *et al.*, 2013). Pengaplikasian imunostimulan sendiri dapat dilakukan pada beberapa jenis ikan baik melalui pakan (oral), perendaman maupun suntikan (injeksi) (Suhermanto, *et al.*, 2013). Pemberian imunostimulan melalui pakan memiliki kelebihan yaitu bahan aktif yang terkandung dalam bahan obat mudah diserap oleh tubuh ikan karena masuk melalui sistem metabolismenya (Dotta, *et al.*, 2014). Salah satu bahan alami yang dapat digunakan untuk meningkatkan respon imun ikan dan ramah lingkungan adalah maggot.

Maggot (*Hermetia illucens*) merupakan salah satu organisme pembusuk karena mengonsumsi bahan-bahan organik untuk tumbuh dan organisme ini berasal dari telur lalat *black soldier*. Maggot digunakan sebagai sumber nutrisi yang sangat baik karena mengandung protein yang tinggi, lipid dan mineral (Sparanghers, *et al.*, 2016). Nilai nutrisi maggot pada umur 6-7 hari yaitu protein 60,2%, Lemak 13,3%, Abu 7,7% dan Karbohidrat 18,8% (Fahmi, *et al.*, 2009). Menurut Uvel dan Engstrom (2007), menyatakan, bahwa maggot sebagai larva dari lalat *black soldier* memiliki kandungan peptida yang melimpah dan beragam yang berpotensi sebagai antimikroba. *Antimicrobial peptides* (Peptida antimikroba) adalah salah satu senyawa yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai alternatif antibiotik untuk mengatasi masalah resistensi bakteri akibat penggunaan antibiotik konvensional.

Selain itu, Maggot memiliki kandungan antibakteri dan antijamur, sehingga apabila dikonsumsi ikan akan membantu meningkatkan ketahanan tubuh ikan terhadap penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan jamur (Amandanisa dan Suryadarma, 2020). Pada penelitian Choi, *et al.* (2014), bahwa pengaruh



kandungan zat aktif pada maggot yaitu asam heksanedioat, dimana zat ini memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram negatif, termasuk *A. salmonicida*.

Salah satu keunggulan maggot yaitu kandungan protein hewani yang sangat tinggi sehingga berpotensi sebagai alternatif sebagai imunostimulan dan sebagai pengganti tepung ikan hingga 100%. Protein tersebut digunakan untuk meningkatkan respon imun non spesifik/ respon imun bawaan. Protein mengaktifasi sistem imun dengan berbagai cara seperti meningkatkan jumlah dan aktivitas sel limfosit T, sel *natural killer* (NK) dan meningkatkan aktivitas makrofag serta dapat melepaskan interferon dan interleukin (Eriani, *et al.*, 2018).

Ketika ada respons dari luar berupa antigen yang masuk dan terjadi infeksi, *Antigen presenting cells* (APCs) akan mempresentasikan epitop (determinan antigen) kepada sel T helper. Setelah menerima epitop dari APCs, sel T helper kemudian meresponsnya dengan mensekresi sitokin. Sekresi sitokin terjadi selama proses inflamasi dan fagositosis (Rousdy dan Wijayanti, 2016). Sitokin menekan aktivitas anti-inflamasi yang buruk dan memproduksi sinyal pro-inflamasi untuk membatasi peradangan jaringan dan kerusakan inang, serta menginduksi inflamasi akibat infeksi atau cedera (Mannaa dan Abdel-Wahhab, 2016). Sitokin proinflamasi diproduksi ketika makrofag teraktivasi dan terlibat dalam reaksi inflamasi. Sitokin proinflamasi akan mengalami peningkatan ketika terjadi reaksi inflamasi, yang disekresi oleh monocytes dan makrofag untuk merespons infeksi parasit, bakteri dan virus pada inang (Zhang dan An, 2009).

*Tumor necrosis factor-alpha* (TNF $\alpha$ ) adalah sitokin proinflamasi utama yang memainkan peran dalam proses inflamasi yang menghadapi invasi patogen dan pertahanan antimikroba, dimediasi melalui limfosit, aktivasi leukosit, proliferasi sel, diferensiasi dan apoptosis. TNF $\alpha$  diproduksi oleh monosit, makrofag, leukosit



polimorfonuklear, sel mast dan sel otot polos selama peradangan akut ikan (Nguyen, *et al.*, 2017).

*Interleukin-1 beta* (IL-1 $\beta$ ) adalah sitokin pro-inflamasi yang paling banyak diteliti, banyak karena perannya dalam memediasi penyakit auto-inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag teraktivasi, monosit, dan sel dendritik, dan mempengaruhi hampir setiap jenis sel, memainkan peran sentral dalam menghasilkan respons sistemik dan lokal terhadap infeksi, cedera, dan tantangan imunologi, meskipun juga dapat memiliki efek yang merusak (Reis, *et al.*, 2012).

IL-1 $\beta$  dilepas oleh monosit dan makrofag serta oleh sel-sel non-imun seperti fibroblas dan sel endotel, selama sel mengalami cedera, infeksi, invasi dan peradangan (Zhang dan An, 2009). Ekspresi sitokin inflamasi telah terbukti sangat berguna untuk melihat Respons inang ikan ketika terjadinya infeksi patogen (Nguyen, *et al.*, 2017).

Oleh karena itu, pada penelitian ini saya ingin mengetahui seberapa besar pemberian maggot jika dijadikan sebagai pakan pada ikan Koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* terhadap tingkat intensitas gen sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ .

## 1.2 Rumusan Masalah

Penyakit yang disebabkan infeksi bakteri *A. salmonicida* dapat menyebabkan kematian massal pada ikan Koi (*C. carpio*) selama proses budidaya. Pencegahan yang ramah lingkungan dan tidak memberikan dampak negatif pada ikan yaitu dengan penggunaan imunostimulan, salah satunya menggunakan bahan alami yakni maggot. Hal ini dikarenakan maggot memiliki kandungan nutrisi yang sangat baik, salah satunya mengandung protein hewani yang tinggi sebesar 60,2%. Selain, berpotensi sebagai imunostimulan, maggot juga berpotensi sebagai pengganti pakan hingga 100%. Kandungan protein tersebut



dimanfaatkan oleh ikan untuk meningkatkan sistem imun non-spesifiknya. Dan setiap adanya infeksi ikan akan memberikan respons dengan sistem pertahanan tubuh berupa mensekresikan sitokin. Salah satu sitokin yang meningkat ketika terjadinya reaksi inflamasi adalah TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang disekresi oleh monocytes dan makrofag untuk merespons infeksi bakteri.

Berdasarkan uraian diatas rumusan masalah dari penelitian ini adalah Bagaimana pemberian maggot jika digunakan sebagai imunostimulan (*Hermetia illucens* larvae) terhadap tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah Untuk menganalisis pemberian maggot (*Hermetia illucens* larvae) terhadap tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada ikan Koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai peranan pemberian maggot yang dimanfaatkan sebagai imunostimulan pada ikan Koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* terhadap tingkat intensitas gen TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Dan diharapkan penelitian ini mampu memberikan kontribusi bagi perkembangan ilmu pengetahuan mengenai penyakit.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ikan Koi (*Cyprinus carpio*)

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Adapun klasifikasi ikan koi (*Cyprinus carpio*) menurut Saanin (1984), adalah sebagai berikut:

Filum	: Chordata
Kelas	: Osteichthyes
Sub Kelas	: Actinopterygii
Super Ordo	: Teleostei
Ordo	: Cypriniformes
Famili	: Cyprinidae
Genus	: <i>Cyprinus</i>
Spesies	: <i>Cyprinus carpio</i>



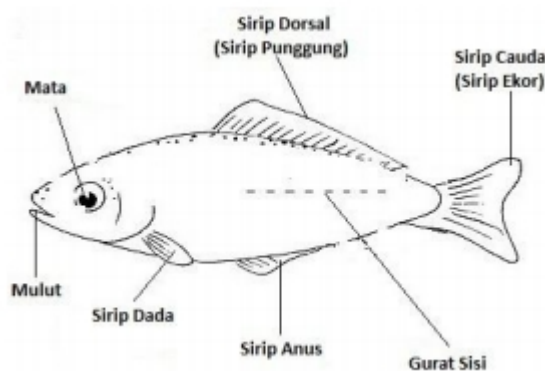
**Gambar 1.** Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) (Prasetya, et al., 2013)

Ikan koi (*Cyprinus carpio*) memiliki bentuk badan bulat panjang dan bersisik penuh. Warna sisiknya sangat bervariasi seperti berwarna putih, kuning, merah menyala, emas, hitam atau kombinasi dari warna tersebut (**Gambar 1.**) (Syafar, 2017). Sirip-sirip yang melengkapi bentuk morfologi ikan koi (*C. carpio*) adalah sebuah sirip punggung, sebuah sirip anus, sebuah sirip ekor, sepasang sirip dada dan sepasang sirip perut (**Gambar 2.**) (Prasetya, et al., 2013). Sirip pada koi



terdiri atas jari-jari keras, jari-jari lunak, dan selaput sirip yang berfungsi sebagai perut hanya memiliki jari-jari lunak sebanyak 9 buah. Sirip anus memiliki 3 jari-jari keras dan 5 jari-jari lunak. Pada sisi badan dari pertengahan batang sampai batang ekor terdapat gurat sisi yang berguna sebagai penerima getaran suara (Susanto, 2000).

Mata ikan koi berwarna merah, hitam dan sedikit keputih-putihan. Ikan koi memiliki bentuk mulut yang tidak terlalu lebar dan tidak memiliki gigi dibagian rahang. Hidung ikan koi berupa lekukan dan tidak digunakan sebagai alat pernapasan. Pada ujung bagian kepala dibawah mulu ikan koi dilengkapi dengan sepasang *barbel* yang merupakan alat indera yang berfungsi untuk mencari makanan saat didalam lumpur (Bactiar, 2002).



Gambar 2. Morfologi Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) (Susanto, 2000)

### 2.1.2 Habitat

Ikan koi (*C. carpio*) memiliki toleransi tinggi terhadap berbagai kondisi air, terutama toleransi terhadap suhu air. Ikan koi (*C. carpio*) dapat hidup pada suhu rendah 4°C dan suhu tinggi 34°C, sesuai dengan Indonesia yang beriklim tropis.

Namun, suhu terbaik untuk pertumbuhan ikan koi (*C. carpio*) berkisar dari 25-30°C (Somerville, et al., 2014).

Habitat ikan koi (*C. carpio*) yaitu di daerah beriklim sedang dan hidup pada daerah perairan air tawar, akan tetapi ikan ini masih bisa hidup pada air yang

sedikit asin. Ikan koi (*C. carpio*) masih bisa bertahan hidup pada air yang bersalinits 10 ppm. Oleh karena itu ikan koi (*C. carpio*) dapat dipelihara di seluruh daerah Indonesia, mulai dari pantai hingga daerah pegunungan. Pada daerah yang mempunyai musim dingin, ikan koi (*C. carpio*) juga mampu bertahan pada kisaran suhu 2-3°C (Luthfi, *et al.*, 2017).

### 2.1.3 Pakan dan Kebiasaan Makan

Ikan koi termasuk jenis ikan pemakan segalanya yang disebut omnivora. Ikan koi mengonsumsi berbagai macam makanan di dasar kolam, baik yang berasal dari binatang seperti cacing, moluska, larva serangga, zooplankton ataupun yang berasal dari tumbuhan seperti memakan batang, daun dan biji tanaman air, serta vegetasi darat yang membusuk (FAO, 2004).

Kebiasaan makan yang dapat dimakan oleh ikan tergantung pada *trophic* level, ukuran, habitat, musim serta alat pencernaannya ikan. Komposisi makanan ikan berbeda antara ikan yang masih kecil dan ikan dewasa. Hal ini karena adanya perbedaan pada bukaan mulut dan kemampuan mendapatkan makanan serta kebutuhan gizinya (Handajani dan Widodo, 2010). Kualitas pakan tidak hanya sebatas pada nilai gizi saja melainkan pada sifat fisik pakan seperti kelarutan, warna, bau, rasa dan anti nutrisi yang dikandung. Pakan yang berkualitas akan mendukung tercapainya tujuan produksi yang optimal (Suryaningsih, 2010).

Ikan koi (*C. carpio*) adalah ikan pemangsa bentos. Kebiasaan ikan ini yaitu sering mengaduk-aduk dasar kolam untuk mencari jasad-jasad organik. Pada saat hidup di alam, ikan koi (*C. carpio*) hidup menepi sambil mengincar makanan berupa binatang-binatang kecil yang biasanya hidup dilapisan lumpur, yang kemudian disedot oleh ikan koi (*C. carpio*) bersama lumpurnya. Diambil yang dapat dimanfaatkan dan sisanya dikeluarkan melalui mulut (Yustiati, *et al.*, 2018). Ikan koi (*C. carpio*) memiliki kebiasaan makan di permukaan, di tengah perairan



dan di dasar perairan. Didalam air/ lumpur ikan koi (*C. carpio*) dapat mengenali makanannya dan mampu mencari makanan, karena ikan koi (*C. carpio*) mempunyai organ penciuman yang sangat tajam yang terletak dipingggi mulutnya yang berupa sepasang *barbel* (Natalist, 2003).

## 2.2 Penyakit Ikan

Kasus penyakit pada ikan merupakan masalah penting untuk ditangani secara serius. Penyakit yang diakibatkan terkait dengan interaksi antara patogen, inang dan lingkungan air yang tidak stabil. Hossain, *et al.* (2008) menyatakan bahwa penyebaran penyakit dapat terjadi karena kontak langsung dengan ikan yang terinfeksi. Salah satu jenis penyakit yang sering dijumpai pada budidaya baik pembenihan maupun pembesaran adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Sebagian besar bakteri patogen, seperti *Aeromonas hydrophila*, *A. Salmonicida*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Yersinia ruckeri*, dan *Cytophaga* adalah bakteri gram negatif.

Dalam menjalankan kegiatan budidaya ikan, penyakit ikan merupakan masalah yang dapat merugikan ekonomi. Penyakit ikan didefinisikan sebagai segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan fungsi tubuh baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya penyakit yaitu kondisi lingkungan, kondisi inang dan adanya patogen. Sehingga, ketika ketiga faktor tersebut berinteraksi tidak seimbang dapat menyebabkan ikan stress dan mempengaruhi mekanisme pertahanan tubuh yang dimilikinya, pada akhirnya ikan menjadi lemah dan mudah diserang penyakit (Kordi, 2004).

## 2.3 Bakteri *Aeromonas salmonicida*

### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri

Menurut Brenner dan Staley (2007), klasifikasi dari bakteri *A. salmonicida*

antara lain:

Filum : Proteobacteria

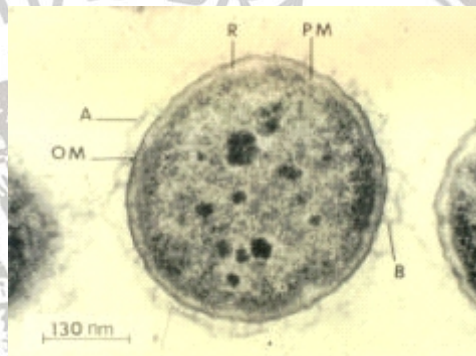
Kelas : Gammaproteobacteria

Ordo : Aeromonadales

Famili : Aeromonadaceae

Genus : *Aeromonas*

Spesies : *Aeromonas salmonicida*



Gambar 3. Bakteri *A. salmonicida*

Jenis bakteri *A. salmonicida* adalah bakteri yang memiliki sifat anaerobik fakultatif dan oksidatif, sehingga dapat hidup di lingkungan perairan tanpa adanya oksigen. Bakteri ini memiliki kemampuan membentuk spora, berbentuk batang memiliki diameter sel berkisar 0,3-1  $\mu\text{m}$  dan panjang 1-35  $\mu\text{m}$ . *A. salmonicida* dapat bertahan lebih lama dalam air tergantung kandungan mineral, pH dan suhu air. Dengan meningkatnya suhu, virulensinya juga bertambah tinggi (Afrianto, et al., 2015).

### 2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangan

Pertumbuhan bakteri merupakan pertambahannya jumlah atau volume serta ukuran sel. Pertumbuhan biasanya dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan



seperti faktor fisika dan faktor kimia yang dapat menyebabkan penurunan kecepatan pertumbuhan bakteri. Menurut Ristiati (2015), pertumbuhan bakteri dibagi menjadi 4 fase yaitu : fase pertama adalah **fase lag** atau biasa disebut fase adaptasi dimana mikroba dapat menyesuaikan kondisi di sekitar lingkungannya.

Fase kedua yaitu **Fase log** atau disebut fase pertumbuhan ekponensial, dimana fase ini bakteri membelah sangat cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik.

Fase ketiga yaitu **fase stasioner** atau disebut fase statis, pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang

mati. Dan fase terakhir **fase death** atau disebut fase kematian, karena pada fase ini populasi bakteri mulai mengalami kematian karena ketersediaan nutrisi dan cadangan energi didalam media mulai habis.

Bakteri gram negatif *A. salmonicida* mampu tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38-41°C dan bakteri ini mengalami pertumbuhan minimal pada suhu 0-5°C sedangkan suhu paling optimal untuk pertumbuhan nya adalah 22-28°C bakteri ini termasuk bakteri anaerob sehingga dapat hidup meski tanpa oksigen (Afrianto dan Lifiawaty, 1992)

### 2.3.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan Bakteri

*Aeromonas salmonicida* merupakan penyebab penyakit *furunculosis*. Bakteri ini akan menyerang ikan air tawar seperti ikan koki (*Carrasius auratus*), Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) dan ikan lele (*Clasias sp.*) (Muqsith, 2013). infeksi *A. salmonicida* menyebabkan proses pembengkakan dan haemoragik di antara jaringan epidermis dan dermis dan berwarna merah secara bertahap dapat meluas. Kerusakan jaringan terjadi dengan adanya pembentukan ulcer pada permukaan tubuh, lebih sering menyerang pada sisi lambung. Pada ikan salmon yang disuntik secara intramuskuler dengan bakteri virulen, target infeksi dikembangkan di tempat infeksi selama 72 jam. Lesi sebagai target dari nekrosis myofibrillar yang berkembang dengan cepat ke pembuluh darah dan terjadi



pendarahan. Pada infeksi akut, dapat merusak organ ginjal anterior, limpa atau miokardium (Priyatna, *et al.*, 2011).

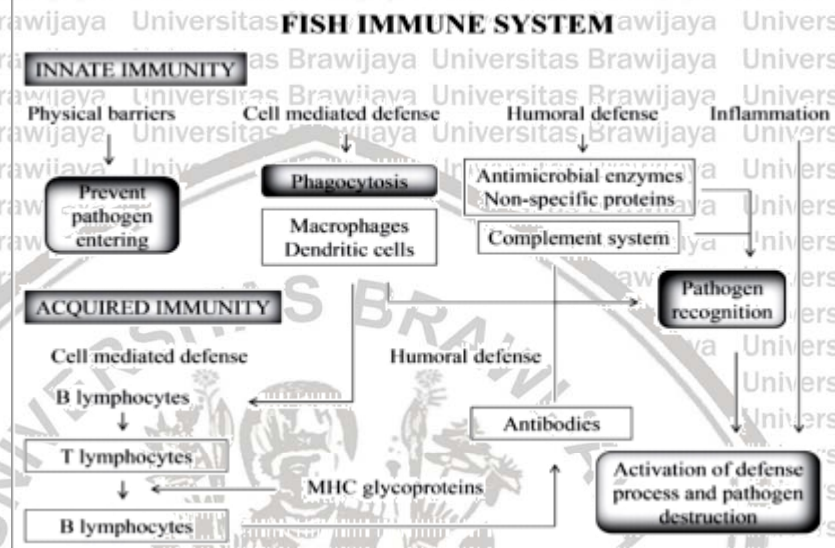
Bakteri ini dapat menyebabkan tingkat kematian tinggi sekitar 80-100% dalam waktu yang singkat (1-2 minggu). Selain itu, pengendalian bakteri ini sangat sulit dilakukan, hal ini dikarenakan hampir selalu ada di air dan menjadi resisten terhadap antibiotik. Ciri khas ikan yang terinfeksi bakteri ini adanya leukopenia, hemoragi, necrosis pada jaringan dan degenerasi pada bagian otot. Perubahan patologi akibat bakteri *A. salmonicida* adalah necrosis jaringan otot, pembekakan subkutan dan bukan *furuncle* sejati. Pada bentuk akit terdapat pendarahan dari luar jaringan pada pangkal sirip dada dan sirip perut. Ikan akan menjadi lemah, berwarna gelap, ulcer dan exophthalmus serta dapat diikuti infeksi sekunder oleh jamur atau bakteri lainnya (Amanu, *et al.*, 2014). selain itu terjadi kerusakan pada organ-organ diantaranya yaitu insang, usus, pankreas, limpa, hati, ginjal, otak dan otot (Arnadottir, *et al.*, 2009).

## 2.4 Sistem Imun

Pengetahuan sistem kekebalan tubuh ikan (**Gambar 4.**) sangat penting untuk evaluasi status kesehatan ikan di bawah kondisi yang berbeda dan ketepatan untuk diagnosis. Selain itu, sebagai penentuan vaksinasi sebagai perlindungan terhadap penyakit pada budidaya. Mekanisme pelindung bawaan pada ikan adalah garis pertama pertahanan dan terdapat hubungan yang jelas antara faktor pertahanan imun bawaan (non-spesifik) dan spesifik serta ketahanan penyakit ikan. Hal ini memberikan pemahaman perubahan dinamis dalam *immunoreactivity* (bawaan dan spesifik) terhadap patogen tertentu pada ikan dapat mengungkapkan mekanisme yang mendasari interaksi host-pathogen yang dapat membantu diagnosis penyakit awal (Adikesavalu *et al.*, 2016). Prinsip-prinsip sistem imun yaitu (i) kombinasi tanggapan imun alami dan spesifik,



(ii) pembagian tugas di antara populasi sel imun spesifik, baik penduduk dan yang bermigrasi, (iii) komunikasi intensif dan sinyal di antara berbagai komponen sistem kekebalan tubuh, (iv) keseimbangan kekuatan, misalnya antara sinyal pro-dan anti-inflamasi, dan (v) variabilitas luas dan inovasi berkelanjutan untuk dapat mengatasi keragaman antigenik (Segner et al., 2012).



**Gambar 4.** Konsep Sistem Imun Pada Ikan (Takashi and Urbinati, 2014)

Pengembangan sifat sistem imun yaitu sistem imun bawaan (*innate immune system*) dan sistem imun daptan (*acquired immune system*). Sistem imun bawaan merupakan respon imun yang bersifat tidak spesifik karena bentuk respon imun tetap sama terhadap semua agen asing dan tidak melibatkan peran memori. Sedangkan sistem imun adaptif bersifat spesifik terhadap antigen yang khas, dimana respon diperoleh secara langsung oleh stimulus struktur molekul dan menghasilkan pertahanan memori spesifik (Wibawan dan Soejoedono, 2013).

Sistem bawaan mencakup semua komponen yang ada di tubuh sebelum munculnya agen patologis, sebagai garis pertahanan pertama yang bertindak lebih cepat daripada sistem spesifik. Di antara komponen-komponen ini ada kulit sebagai penghalang fisik, sistem komplemen, enzim antimikroba, interleukin, interferon dan sel pertahanan organik, seperti granulosit, monosit, makrofag dan



sel pembunuh alami. Sedangkan sistem kekebalan tubuh adaptif terjadi setelah proses pengenalan dan pertahanan oleh sistem imun bawaan yang dilanjutkan dengan perkembangan limfosit T dan pematangan serta memproduksi antibodi (Takashi dan Urbinati, 2014).

#### 2.4.1 Sistem Imun Non Spesifik

Respons imunitas pada hewan merupakan perlindungan diri terhadap infeksi maupun preservasi fisiologik - homeostasi. Respons imunitas hewan akuatik terdiri dari Respons non spesifik dan spesifik. Berbeda dengan udang, pada ikan terdapat populasi sel B dan sel T. Sel ini sangat berperan dalam Respons imunitas baik seluler maupun humoral (Abdul Syafar, 2017). Komunikator dan amplikator dalam fungsi dan mekanisme pertahan humoral dan seluler ikan dilakukan oleh limfosit, interleukin, interferon dan sitokin (Sommerset, *et al.*, 2005).

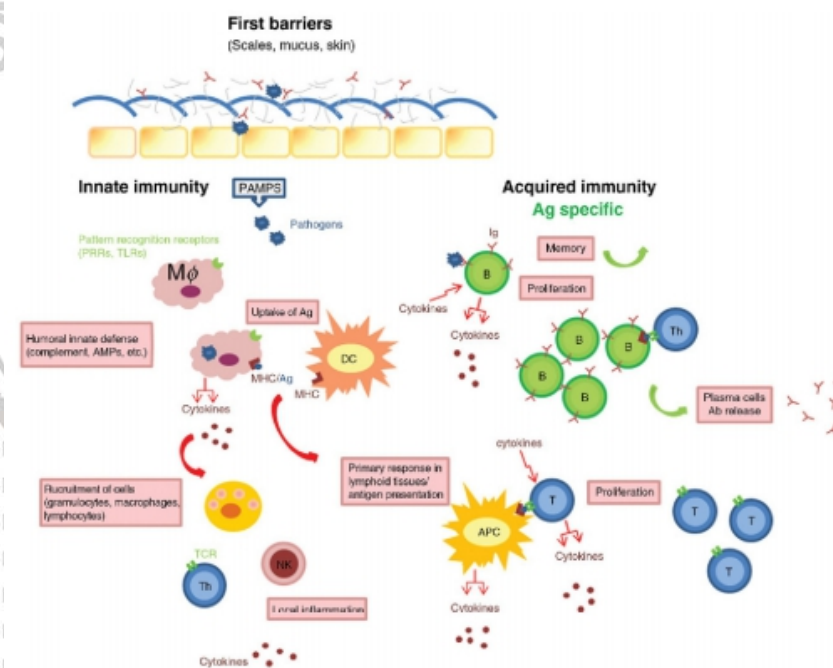
Ikan, sama seperti manusia yang memiliki sistem kekebalan yang terdiri dari sel imun, reseptor dan kurir kimia. Komponen fungsional sistem kekebalan tubuh ikan memiliki potensi untuk membentuk pertahanan yang sangat terorganisir terhadap infeksi patogen. Umumnya sistem kekebalan tubuh sangat kompleks dan terintegrasi dengan mekanisme yang membuat beberapa komponen dapat memberikan cadangan jika komponen lain gagal. Imunitas humoral ditandai dengan produksi antibodi (imunoglobulin spesifik) yang disekresikan oleh sel B mengikuti aktivitas sel B *antigen-mediated*. Imunitas seluler adalah dimediasi oleh sel T teraktivasi, yang mengeluarkan sitokin dan secara langsung membunuh patogen (Chen, *et al.*, 2014). Respons imun ikan dapat dilihat pada **Gambar 5**.

Pertahanan dimulai dengan sistem imun bawaan yang memungkinkan respons cepat terhadap serangan patogen. Sistem ini memberikan tanggapan non-spesifik yang diaktifkan oleh Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) berperan mengenai patogen, misalnya, lipopolisakarida bakteri (LPS). PAMP



pada patogen bekerja dengan Pattern Recognition Receptors (PRR) pada inang yang mengenali baik molekul asing maupun endogen sehingga dianggap sebagai sinyal terdapatnya patogen. Elemen efektor utama dari sistem kekebalan tubuh bawaan dari ikan termasuk faktor humoral seperti lisozim atau komplemen, serta sel fagosit seperti granulosit, monosit / makrofag dan sel pembunuh alami. Fungsi utama sel fagositik adalah fagositosis jaringan dan mikroorganisme, untuk mensekresikan respon imun yang mengatur faktor dan untuk menjembatani respon imun bawaan dan adaptif. Kemudian sistem imun adaptif merupakan satu set komponen humoral dan seluler yang memungkinkan respon spesifik patogen.

Sel yang terlibat dalam sistem kekebalan spesifik adalah limfosit T dan B yang memediasi respon seluler dan humoral. Limfosit ikan B menghasilkan imunoglobulin yang terutama IgM tetramerik (Segner, *et al.*, 2012).



**Gambar 5.** Mekanisme Respon Imun pada Ikan (Castro and Tafalla, 2015)

Komponen imun non-spesifik atau *innate* adalah penghalang pertama yang harus dihadapi oleh mikroorganisme dalam kontak mereka dengan inang.

Komponen ini melimpah di permukaan mukosa dan interaksinya sangat diatur

untuk menghindari reaksi yang berlebihan. Pada bagian ini komponen *innate* humoral dan seluler terdapat di permukaan mukosa teleosts (Gomez, *et al.*, 2013).

Respons dan faktor seluler seperti sel makrofag, sel killer, neutrofil dan hipersensitivitas. Selain itu barier mekanik dan kimiawi seperti kulit, sisik dan mukus pada permukaan tubuh ikan serta insang juga merupakan alat pertahanan tubuh ikan yang bersifat non-spesifik (Abdul Syafar, 2017).

## 2.5 Sitokin

Sitokin adalah protein berbobot molekul kecil atau pembawa pesan peptida antara jaringan dan sistem kekebalan tubuh dan berpartisipasi dalam banyak proses fisiologis. Berat molekul sitokin kira-kira 8-80 kDa. Sitokin menekan aktivitas anti-inflamasi yang buruk dan memproduksi sinyal pro-inflamasi untuk membatasi pedangan jaringan dan kerusakan inang, serta menginduksi inflamasi akibat infeksi atau cedera. Kombinasi sitokin yang berbeda menimbulkan konsekuensi yang berbeda seperti peradangan, proliferasi dan angiogenesis. Sitokin dapat diklasifikasikan tergantung pada (1) asalnya sel; (2) aktivitas spektrum; (3) kategori aktivitas yang dipengaruhi; (4) sel-sel target; atau (5) fitur interaksi spesifik pada ligan-reseptor. Sitokin dapat diproduksi oleh hampir setiap jenis sel yang berinti dalam menanggapi rangsangan yang merugikan. Sebagian besar, sitokin diproduksi dan bertindak secara lokal. Sebagian kecil memasuki sirkulasi sistemik dalam jumlah yang relevan secara biologis dan beberapa memiliki peran fisiologis yang penting (Mannaa and Abdel-Wahhab, 2016).

Sitokin adalah pengatur utama sistem kekebalan tubuh. Diproduksi di lokasi masuknya patogen, sitokin menggerakkan sinyal-sinyal inflamasi yang mengatur kapasitas residen dan mengatur fagosit untuk menghancurkan patogen yang baru menyerang inang. Selain itu, sitokin juga mengatur fungsi presentasi antigen dalam sel dendritik (DCs), dan migrasi ke kelenjar getah bening untuk memulai



respon imun adaptif. Sel T CD4<sup>+</sup>, juga dikenal sebagai sel T-helper (Th), memainkan peran penting dalam mengatur respons imun adaptif ke berbagai agen infeksi. Setiap subset sel mengekspresikan set unik sitokin tanda tangan serta faktor transkripsi. Profil dan besarnya sitokin yang dihasilkan sebagai respons terhadap invasi organisme asing atau terhadap sinyal bahaya lainnya dengan mengaktifkan sel T CD4<sup>+</sup> sendiri, oleh DC mitra, dan / atau jenis sel lainnya selama proses diferensiasi, menentukan sebagian besar apakah respons imun selanjutnya akan memiliki efek menguntungkan atau merugikan bagi inang.

Sel T dan B sangat sensitif terhadap sitokin, dan lingkungan sitokin yang memainkan peran penting pada fungsi efektor dan sifat homing sel T dan B, serta diferensiasinya menjadi sel memori (Wang and Secombes, 2013).

Sitokin adalah suatu glikoprotein yang berasal dari sel T helper, sel natural killer (NK) dan makrofag, yang berperan penting pada respons tubuh melawan infeksi. Sel T helper terdiri dari dua set subset yang masing-masing menghasilkan sitokin pengatur perbedaan fungsi imun efektor dan bereaksi satu sama lain. Sel T helper tipe 1 (Th-1) disebut sitokin pro-inflamasi, sitokin ini mengaktifkan makrofag dan menghasilkan IFN- $\gamma$  (*interferon gama*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alfa*), IL-2 (interleukin-2), IL-6 (interleukin-6) dan IL-1(interleukin-1), serta menginduksi mekanisme imun efektor sitotoksik dari makrofag. Sebaliknya, sel T helper tipe 2 (Th-2) menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13. Sitokin ini menginduksi pembentukan antibodi tetapi juga menghambat fungsi makrofag dan disebut sitokin anti inflamasi (Irawati, *et al.*, 2008).

Sitokin dapat memodulasi respons imun dengan cara berikatan dengan reseptor yang sesuai. Sitokin berasal dari makrofag, limfosit, granulosit, DC, sel mast, dan sel epitel, dan dapat dibagi menjadi interferon (IFN), interleukin (IL), faktor nekrosis tumor (TNF), faktor pertumbuhan (TGF), Faktor stimulasi koloni (CSF) dan kemokin (Jacobson, *et al.*, 2017). Dalam sistem imun *innate*, makrofag



dapat mengeluarkan IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , dan kemokin seperti IL-8 dan MCP-1, yang semuanya sangat diperlukan untuk perekrutan makrofag, neutrofil, dan limfosit ke jaringan yang terinfeksi dan aktivasi mereka sebagai eliminators pathogen. Sementara itu, sitokin yang dilepaskan oleh fagosit dalam jaringan juga dapat menginduksi protein fase akut, termasuk lektin pengikat mannan (MBL) dan protein reaktif-C (CRP), dan mendorong migrasi DC. Semua sitokin ini dapat ditemukan pada ikan teleostei (Zhu, *et al.*, 2013).

### 2.5.1 Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  merupakan sitokin yang bersifat sebagai pirogen. Pada kadar rendah sitokin ini dapat menghambat pertumbuhan parasit dengan mengaktifkan sistem imun seluler, dan juga dapat membunuh parasit secara langsung akan tetapi aktifitas sitokin ini sangat lemah. Peran ganda dari sitokin terutama TNF- $\alpha$  yaitu pada kadar yang sesuai akan memberi perlindungan dan penyembuhan, akan tetapi jika kadar berlebih yang mungkin merupakan tanggapan terhadap hiperparasitemia ataupun pertumbuhan parasit yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati, *et al.*, 2008).

Pada umumnya, produksi TNF sebagian merupakan respon terhadap invasi mikroorganisme dan merupakan sebagian yang penting dari pertahanan tubuh terhadap infeksi bersama dengan faktor lain seperti IL-2. TNF dapat menstimulasi proliferasi limfosit B dan T dan menyebabkan sekresi antibodi, menyerupai efek IL-1 terhadap limfosit. Pengenalan sel dapat pula difasilitasi oleh TNF, karena dapat menstimulasi ekspresi antigen histokompatibilitas pada permukaan sel, pengaruh yang lain mungkin adalah aktivitas sel sitolitik dan sitotoksik. TNF mungkin juga mempengaruhi monosit makrofag untuk menimbulkan diferensiasi dan produksi sitokin lain. Mungkin juga ada lengkung umpan balik untuk mengontrol



makrofag oleh bahan produknya sendiri, karenanya TNF mempunyai peran dalam mengontrol inflamasi (Chaudhry, *et al.*, 2013).

### 2.5.2 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

IL-1  $\beta$  adalah salah satu dari beberapa sitokin yang ditemukan pada ikan, yang memiliki banyak kesamaan dengan bagian mamalia, ada juga yang beberapa perbedaan. Sebagai contoh, pada mamalia gen IL-1 $\beta$  memiliki struktur 7 intron/ 6 exon yang serupa pada cyprinidae, tetapi pada salmonida hanya ada 6 exon. IL-1 $\beta$  menginduksi ekspresi COX2 dan MHC II dalam makrofag dan ketika adanya bakteri masuk akan meningkatkan fagositosis leukosit peroteneal dan resisten terhadap bakteri yang menyerang dikemudian hari (Secombes, *et al.*, 2011).

IL-1 $\beta$  Juga dikenal sebagai katabolin, IL-1 $\beta$  adalah anggota dari keluarga sitokin interleukin-1. Sitokin ini diproduksi oleh makrofag teraktivasi sebagai proprotein, yang diproses secara proteolitik menjadi bentuk aktifnya dengan caspase-1. IL-1 $\beta$  adalah mediator penting dari respon inflamasi, dan terlibat dalam berbagai aktivitas seluler, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis (Chaudhry, *et al.*, 2013).

IL-1 $\beta$  adalah sitokin pro-inflamasi yang paling banyak diteliti, banyak karena perannya dalam memediasi penyakit auto-inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag teraktivasi, monosit, dan sel dendritik dan mempengaruhi hampir setiap jenis sel, memainkan peran sentral dalam menghasilkan respons sistemik dan lokal terhadap infeksi, cedera, dan tantangan imunologi, meskipun juga dapat memiliki efek yang merusak. IL1 $\beta$  mengarahkan aktivitasnya dengan mengikat reseptor IL-1 tipe I (IL-1RI), yang kemudian merekrut protein aksesori reseptor IL-1 (IL-1RAP) membentuk kompleks yang memicu serangkaian peristiwa fosforilasi yang mengarah ke aktivasi I $\kappa$ B kinase (IKK) dan jalur MAPK. Jalur pensinyalan ini pada gilirannya mengaktifkan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan AP1,



menghasilkan induksi gen yang mengkode kemokin, sitokin, protein fase akut, molekul adhesi sel, dan enzim yang terlibat dalam produksi zat pro-inflamasi kecil (Reis, *et al.*, 2012).

Inflamasi adalah proses penting mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh berbagai rangsangan terhadap organisme. Salah satunya sitokin dengan contoh IL-1 $\beta$  kelompok IL-1 yang berfungsi dalam proses pro dan anti inflamasi dan diisolasi dari cDNA makrofag. IL-1 $\beta$  dapat diproduksi oleh banyak sel termasuk monosit, makrofag dan sel endotel. IL-1 $\beta$  menginduksi ekspresi gen inflamasi untuk meningkatkan respon inflamasi (Qiong Yang *et al.*, 2017). Selama inflamasi, IL-1 $\beta$  menginduksi ekspresi beberapa gen pro-inflamasi untuk meningkatkan respon inflamasi seperti IL-1 $\beta$  itu sendiri, IL-6, IL-8, protein kemoatraktan monosit 1 dan siklooksigenase 2 (Buss, *et al.*, 2004).

## 2.6 Immunostimulan

Pemberian imunostimulan adalah salah satu upaya yang dilakukan untuk menghindari dampak negatif penggunaan antibiotik dan obat-obatan kimia lainnya. Immunostimulan merupakan zat kimia atau bahan yang mengandung zat aktif yang diberikan kepada ikan dengan tujuan untuk meningkatkan sistem ketahanan tubuhnya. Immunostimulan sendiri terdiri dari 10 kelompok yaitu produk bakteri, jamur, ragi/khamir, kitin dan kitosan, glikan-polisakarida, ekstrak tumbuhan dan hewan, bahan sintesis, peptida dan sitokinin (Suhermantp, *et al.*, 2014).

Imunostimulan merupakan bahan yang dapat meningkatkan sistem imun dengan cara menginduksi atau meningkatkan aktivitas dari komponen-komponennya. Immunostimulan diklasifikasikan menjadi 2 yaitu imunostimulan spesifik dan imunostimulan non-spesifik. Perbedaan dari keduanya terletak pada cara kerjanya. Immunostimulan spesifik seperti namanya bersifat



antigenik spesifik, sedangkan imunostimulan tidak spesifik bekerja dengan menstimulasi respon imun (Sari, 2016).

## 2.7 Strategi Pemberian Imunostimulan

Aplikasi imunostimulan sudah banyak dilakukan pada berbagai jenis ikan melalui perendaman, pakan ataupun melalui suntikan. Berbagai penelitian dilakukan untuk mendapatkan bahan yang dapat dimanfaatkan sebagai stimulus untuk meningkatkan kekebalan tubuh ikan dalam menanggulangi penyakit.

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, mikroorganisme yang berbahaya pada ikan maupun pada udang (Suhermanto, *et al.*, 2014). metode penyuntikan dan perendaman sangat cocok pada budidaya intensif, metode ini membutuhkan penanganan yang sangat ekstra terhadap ikan dan membutuhkan tenaga yang lebih besar serta memakan waktu. Sedangkan, metode oral termasuk metode yang paling ekonomis, cocok diterapkan pada budidaya ikan ekstensif dapat dilaksanakan secara masal dan tidak menimbulkan stres pada ikan (Sari, 2016).

## 2.8 Maggot

Maggot merupakan larva serangga lalat tentara hitam (Siptera : Stratiomyidae, Genus *Hermetia*) yang hidup di bungkil kelapa sawit (Nayar, *et al.*, 1981). Penggunaan maggot sebagai bahan baku pakan mempunyai berbagai keunggulan, diantaranya mudah diperoleh, dapat mereduksi sampah organik, tidak membawa atau menjadi agen penyakit, serta untuk mendapatkannya tidak memerlukan teknologi tinggi.

Maggot berwarna hitam dan bagian segmen basal abdomennya berwarna transparan (*wasp waist*) sehingga sekilas menyerupai abdomen lebah. Panjang lalat berkisar antara 15-20 mm dan mempunyai waktu hidup lima sampai delapan hari. Saat lalat dewasa berkembang dari pupa, kondisi sayap masih terlipat kemudian mulai mengembang sempurna hingga menutupi bagian torak. Lalat



dewasa tidak memiliki bagian mulut yang fungsional, karena lalat dewasa hanya beraktivitas untuk kawin dan bereproduksi sepanjang hidupnya. Kebutuhan nutrisi lalat dewasa tergantung pada kandungan lemak yang disimpan saat masa pupa. Ketika simpanan lemak habis, maka lalat akan mati (Makkar, *et al.*, 2014). Berdasarkan jenis kelaminnya, lalat betina umumnya memiliki daya tahan hidup yang lebih pendek dibandingkan dengan lalat jantan (Tomberlin, *et al.*, 2009). Morfologi maggot dapat dilihat pada **Gambar 6**.



**Gambar 6.** Morfologi Larva Maggot (Wangko, 2014)

### 2.8.1 Siklus Hidup

Maggot mengalami beberapa tahapan selama siklus hidupnya, yang diawali dengan telur yang dihasilkan oleh black soldier, kemudian telur menetas menjadi larva, larva berkembang menjadi pupa, dan akhirnya pupa menjadi black soldier dewasa. Siklus hidup maggot dapat dilihat pada **Gambar 7**.

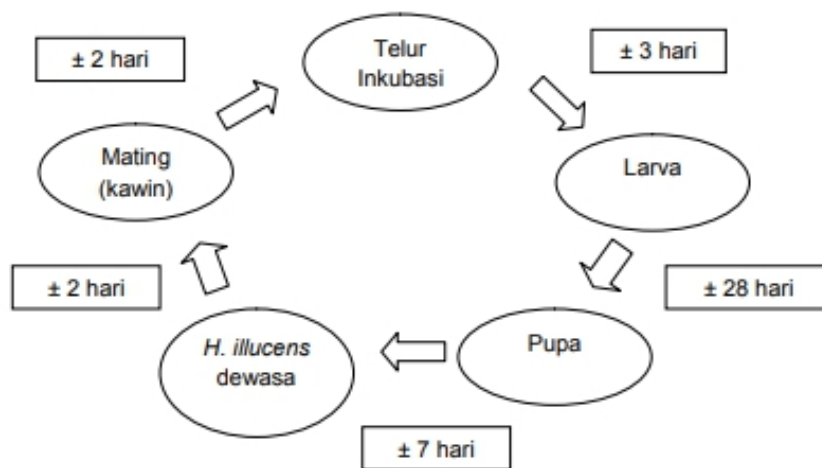
Telur serangga *H. illucens* melewati masa inkubasi dan menetas pada hari ke-3-6 setelah diletakkan oleh induk betina. Telur yang telah menetas akan menjadi larva yang biasa dikenal sebagai maggot. Fase larva berlangsung selama 4 minggu. Setelah itu, fase pupa selama 6-7 hari yang kemudian menjadi *H. illucens* dewasa (*Black Soldier Fly*) yang berlangsung selama 6-7 hari (Fahmi, 2015).

Fase dewasa serangga *H. illucens* merupakan fase dengan yang cukup pendek yaitu 6-8 hari, jika dibandingkan dengan fase dewasa serangga domestik yang memiliki fase dewasa selama 2 hingga 3 bulan, fenomena ini menunjukkan larva *H.*



*illucense* tidak terindikasi sebagai agen penyebaran penyakit (Tomberlin, et al. 2002).

Siklus hidup lalat *H. illucens* mulai dari telur hingga menjadi lalat dewasa berlangsung selama 40-43 hari, tergantung dari kondisi lingkungan dan media pakan yang diberikan. Lalat betina akan meletakkan telurnya di dekat sumber pakan, seperti pada bongkahan kotoran unggas atau ternak, tuumpukan limbah bungkil inti sawit (BIS) dan limbah organik lainnya. Induk betina lalat ini tidak akan meletakkan telurnya diatas sumber pakan secara langsung dan tidak akan mudah terusik ketika sedang bertelur. Oleh sebab itu, umumnya daun pisang yang telah kering atau potongan kardus yang berongga diletakkan di atas media pertumbuhan sebagai tempat telur lalat ini (Mokolengsang et al., 2018).



Gambar 7. Siklus Hidup *H. illucens* (Caruso, et al., 2014)

## 2.8.2 Habitat

Maggot atau belatung dari black soldier fly atau *Hermetia Illuscens* dapat mengubah sampah menjadi protein dan lemak dan mengurangi massa sampah sampai 50% sampai 60% sehingga dapat digunakan sebagai solusi untuk mengurangi pencemaran limbah organik. Maggot umumnya dikenal sebagai organisme pembusuk karena kebiasaannya mengkonsumsi bahan-bahan organik. Maggot dapat tumbuh pada bahan organik yang membusuk di wilayah temperate

dan tropis. Maggot dewasa tidak makan, tetapi hanya membutuhkan air sebab nutrisi hanya diperlukan untuk reproduksi selama fase larva. *Hermetia illucens* dalam siklus hidupnya tidak hinggap dalam makanan yang langsung dikonsumsi manusia (Murni dan Early, 2015).

Larva lalat BSF dapat tumbuh dan berkembang subur pada media organik, kotoran sapi, kotoran babi, kotoran ayam, sampah buah dan limbah organik lainnya. Kemampuan larva BSF ini adalah dapat hidup pada berbagai media yang terkait dengan karakteristiknya yang mempunyai toleransi pH yang cukup luas (Mangunwardoyo, *et al.*, 2011). Suhu yang lebih hangat atau di atas 30°C menyebabkan lalat dewasa menjadi lebih aktif dan produktif. Suhu optimal larva untuk tumbuh dan berkembang adalah 30°C tetapi pada suhu 36°C menyebabkan pupa tidak dapat mempertahankan hidupnya sehingga tidak mampu menetas menjadi lalat dewasa. Pemeliharaan larva dan pupa BSF pada suhu 27°C berkembang empat hari lebih lambat dibanding dengan suhu 30°C (Tomberlin, *et al.*, 2009).

### 2.8.3 Kandungan

Maggot merupakan salah satu larva lalat yang memiliki kandungan protein hewani yang cukup tinggi yaitu 40-50%, lemak berkisar 29-32%, sehingga berpotensi sebagai pakan pengganti tepung ikan hingga 100%. Selain itu, tepung maggot mengandung bahan kering sebesar 57,96-60,42%, protein sebesar 64,59-75,32% dan energi sebesar 62,03-64,77%. maggot juga memiliki kandungan antijamur dan antimikroba sehingga jika dikonsumsi ikan akan tahan terhadap penyakit yang disebabkan bakteri dan jamur (Amandanisa dan Suryadarma, 2020). Nilai nutrisi maggot pada umur 6-7 hari yaitu protein: 60,2%; lemak: 13,3%; abu: 7,7%; karbohidrat: 18,8%. Nilai kandungan protein tersebut lebih tinggi jika dibandingkan dengan maggot yang berumur lebih tua dengan kandungan protein sebesar 32,3% (Fahmi *et al.*, 2009).



Maggot pada instar ke 4 hingga instar ke 6 mengandung senyawa antibakteri yakni asam haksanedioat yang secara efektif menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif. Sehingga dapat disimpulkan bahwa maggot dapat digunakan sebagai kandidat antibakteri baru untuk mengobati penyakit akibat bakteri (Choi dan Mei Hua, 2014). Menurut Uvel dan Engstrom (2007), menyatakan, bahwa maggot sebagai larva dari lalat *black soldier* memiliki kandungan peptida yang melimpah dan beragam yang berpotensi sebagai antimikroba. *Antimicrobial peptides* (Peptida antimikroba) adalah salah satu senyawa yang sangat potensial untuk dikembangkan sebagai alternatif antibiotik untuk mengatasi masalah resistensi bakteri akibat penggunaan antibiotik konvensional.

## 2.9 Analisis Biologi Molekuler

### 2.9.1 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu proses yang dapat memisahkan atau memigrasikan fragmen DNA pada matriks berpori di bawah pengaruh medan listrik. Elektroforesis dilakukan untuk menentukan keutuhan DNA total. Elektroforesis memisahkan DNA berdasarkan bobot molekul dan muatannya dengan menggunakan media pemisah. Kecepatan pergerakan ini tergantung pada ukuran molekul DNA, kerapatan media gel yang dilalui DNA, serta arus listrik yang diberikan untuk bermigrasi molekul DNA (Novitasari, *et al.*, 2014).

### 2.9.2 Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR merupakan salah satu metode sebagai solusi untuk mendeteksi jumlah menit dari satu spesies atau sekelompok spesies berdasarkan amplifikasi eksponensial dari urutan DNA target. Target DNA yang digunakan data salinan tunggal atau beberapa target salinan. Salinan nucleus DNA memiliki sensitivitas tinggi dan jumlah salinan lebih konstan dalam sel yang berbeda dari jaringan yang



berbeda sehingga diduga layak untuk keperluan kualifikasi target DNA. Pada ikan biasanya lebih difokuskan pada penggunaan mitokondria DNA (mtDNA) sebagai target dan memudahkan dalam identifikasi dan kuantifikasi (Pardo et al., 2013).

*Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) merupakan salah satu teknik analisis yang paling banyak digunakan dalam biologi molekuler modern (Vaerman, et al., 2004). Dibandingkan dengan teknik PCR konvensional (*end-point* PCR), *Real-time* PCR memiliki berbagai keunggulan, yaitu amplifikasi atau perbanyakan fragmen DNA yang dapat diamati seketika (secara *realtime*) dan juga dapat menentukan konsentrasi target molekul DNA hasil amplifikasi.

*Real-time* PCR mendeteksi ampikon dengan mengukur adanya peningkatan fluoresensi yang berpendar ketika terikat dengan *doubled stranded* DNA. Fluoresensi yang dihasilkan sebanding dengan DNA template yang teramplifikasi. Metode ini dapat mendeteksi dengan level kontaminasi 1%.

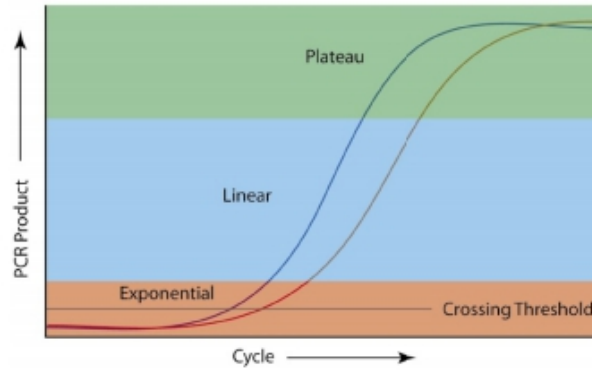
Dalam RT-PCR, penanda fluoresen berfungsi sebagai detektor. Visualisasi dari sinyal fluoresen tersebut selama proses PCR berlangsung akan membentuk plot amplifikasi. Plot tersebut menggambarkan jumlah ampikon seiring bertambahnya siklus dalam PCR, yang mana secara umum terbagi menjadi tiga fase yaitu fase awal, fase eksponensial dan fase *plateau* seperti pada **Gambar 8**. (Vaerman, et al., 2004)

Secara umum, RT-PCR terbagi menjadi tiga fase yaitu fase awal, fase eksponensial dan fase *plateau*. Fase pertama disebut sebagai fase eksponensial yang mana jumlah substrat melimpah dan produk yang dihasilkan masih sedikit.

Pada fase ini terjadi penambahan jumlah produk secara eksponensial dan efisiensi reaksi mencapai 100%. Pada fase kedua, yaitu fase linier, akumulasi produk semakin bertambah namun efisiensinya semakin berkurang dan jumlah reagen mulai terbatas sampai pada akhirnya memasuki fase ketiga, yaitu fase mendatar yang mana pembentukan produk mulai terhentu dikarenakan jumlah



reagen yang habis dan/atau aktivitas enzim yang menurun (VanGuilder, et al., 2008).



Gambar 8. Fase PCR (VanGuilder, et al., 2008).



### 3. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

#### 3.1 Landasan Teori

Ikan Koi (*Cyprinus carpio*) merupakan salah satu ikan yang memiliki banyak peminat karena keindahan bentuk tubuhnya serta variasi warnanya. Ikan ini juga dipercaya oleh para pecintanya akan membawa keberuntungan (Kusrini, *et al.*, 2015). Pada tahun 2013 produksi ikan mas koi di Provinsi Jawa Tengah mencapai 8.707 ton dan pada tahun 2014 meningkat menjadi 10.377 ton. Meningkatnya permintaan pasar terhadap ikan mas koi mendorong pembudidaya ikan untuk meningkatkan system budidaya kearah intensif. Namun disisi lain system budidaya ini menimbulkan masalah baru yaitu masalah penyakit (Arindita, *et al.*, 2014). salah satu penyakit yang sering kali dijumpai dalam kegiatan budidaya ikan Koi (*C. carpio*) adalah infeksi bakteri *A. salmonicida*.

*Aeromonas salmonicida* adalah salah satu spesies dari genus *Aeromonas* yang bersifat patogen dan sangat berbahaya pada budidaya intensif ikan jenis salmonid. *Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri penyebab furunculosis pada ikan yang dapat mengakibatkan kerugian ekonomi di dalam budidaya ikan air tawar (Priyatna, *et al.*, 2011). Biasanya para pembudidaya mengatasi penyakit ini dengan menggunakan antibakteri, antibiotik, atau obat-obatan kimia lainnya.

Penggunaan antibakteri banyak digunakan oleh para pembudidaya dan dianggap sebagai solusi yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. salmonicida*, namun jika penggunaannya berkepanjangan dapat mengakibatkan bertambahnya jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik, menyebabkan residu dan dapat mencemari lingkungan. (Sumino, *et al.*, 2013). oleh karena itu, dibutuhkan upaya pemberian imunostimulan dari bahan alami yang ramah lingkungan.



Maggot merupakan salah satu organisme pembusuk karena mengonsumsi bahan-bahan organik untuk tumbuh dan organisme ini berasal dari telur lalat *black soldier*. Kandungan protein maggot cukup tinggi, yaitu 44,26% dengan kandungan lemak berkisar 29,65%. Selain itu, maggot juga memiliki kandungan antibakteri dan antijamur, sehingga apabila dikonsumsi ikan akan membantu meningkatkan ketahanan tubuh ikan terhadap penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan jamur (Amandanisa dan Suryadarma, 2020). Hal ini, buktikan pada penelitian Choi, *et al.* (2012), bahwa pengaruh kandungan zat aktif pada maggot yaitu asam heksanedioat, dimana zat ini terdapat aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram negatif, termasuk *A. salmonicida*.

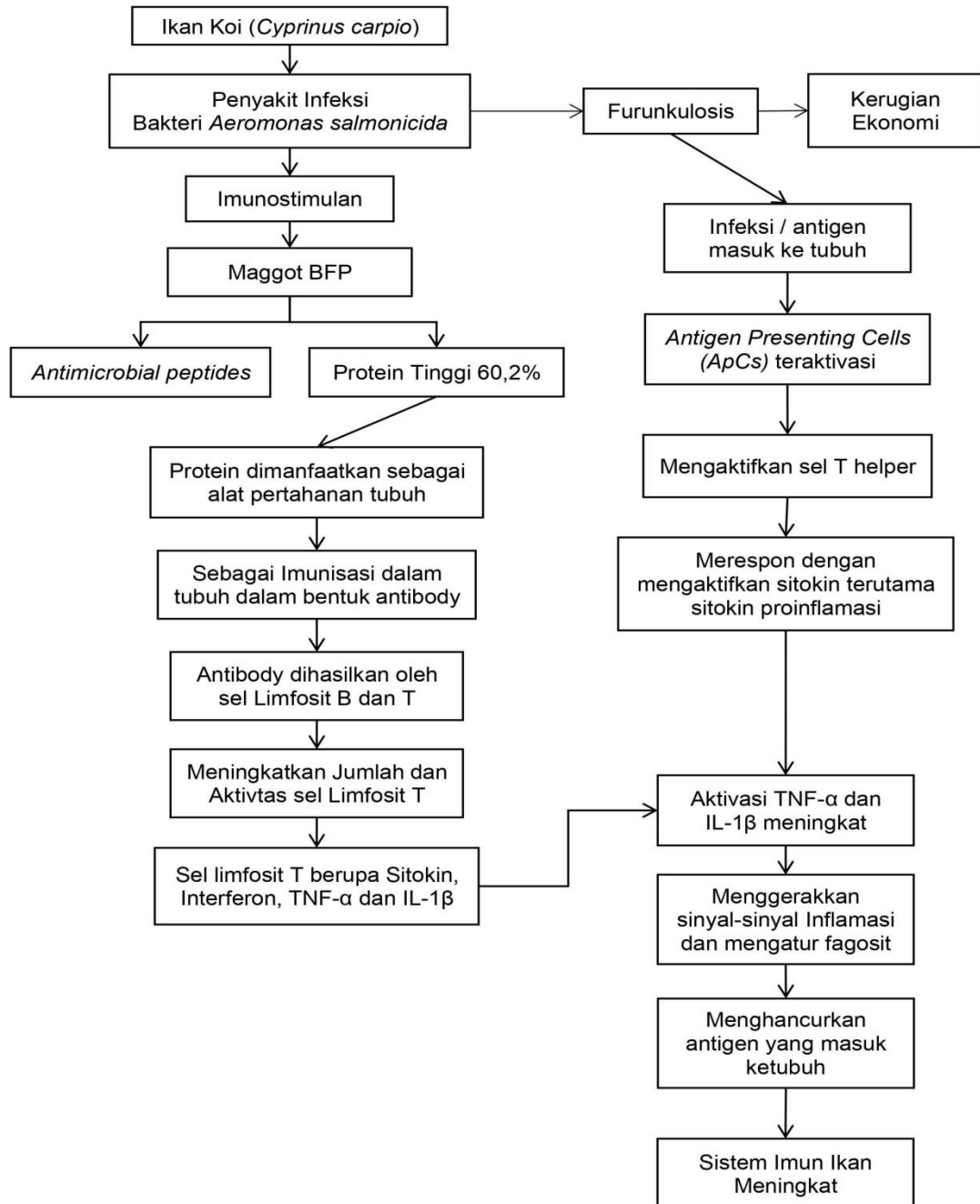
Ketika ada Respons dari luar berupa antigen yang masuk dan terjadinya infeksi, *Antigen presenting cells* (APCs) akan mempresentasikan epitop (determinan antigen) kepada sel T helper. Kemudian sel T helper meresponsnya dengan mensekresi sitokin (Rousdy dan Wijayanti, 2016). Sitokin pro-inflamasi akan mengalami peningkatan ketika terjadi reaksi inflamasi, yang disekresi oleh monocytes dan makrofag untuk merespons infeksi parasit, bakteri dan virus pada inang (Zhang dan An, 2009). Yang tergolong dalam kelompok sitokin pro-inflamasi adalah  $TNF\alpha$  dan  $IL-1\beta$ .

Eksresi sitokin inflamasi telah terbukti sangat berguna untuk melihat Respons inang ikan ketika terjadinya infeksi patogen (Nguyen, *et al.*, 2017). Deteksi ekspresi sitokin menggunakan mRNA inang yang terinfeksi kemudian dianalisis. Salah satu metode analisis untuk melihat Ekspresi sitokin adalah metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

### 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Berdasarkan landasan teori yang sudah dipaparkan sebelumnya, sehingga penelitian tentang penggunaan imunostimulan dengan memanfaatkan maggot

perlu dilakukan. Pada penelitian ini diharapkan dengan pemberian maggot dapat meningkatkan ketahanan non-spesifik terutama pada tingkat intensitas gen ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida*. Kerangka konsep penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar 10**.



**Gambar 9.** Kerangka Konsep Penelitian



### 3.3 Hipotesis

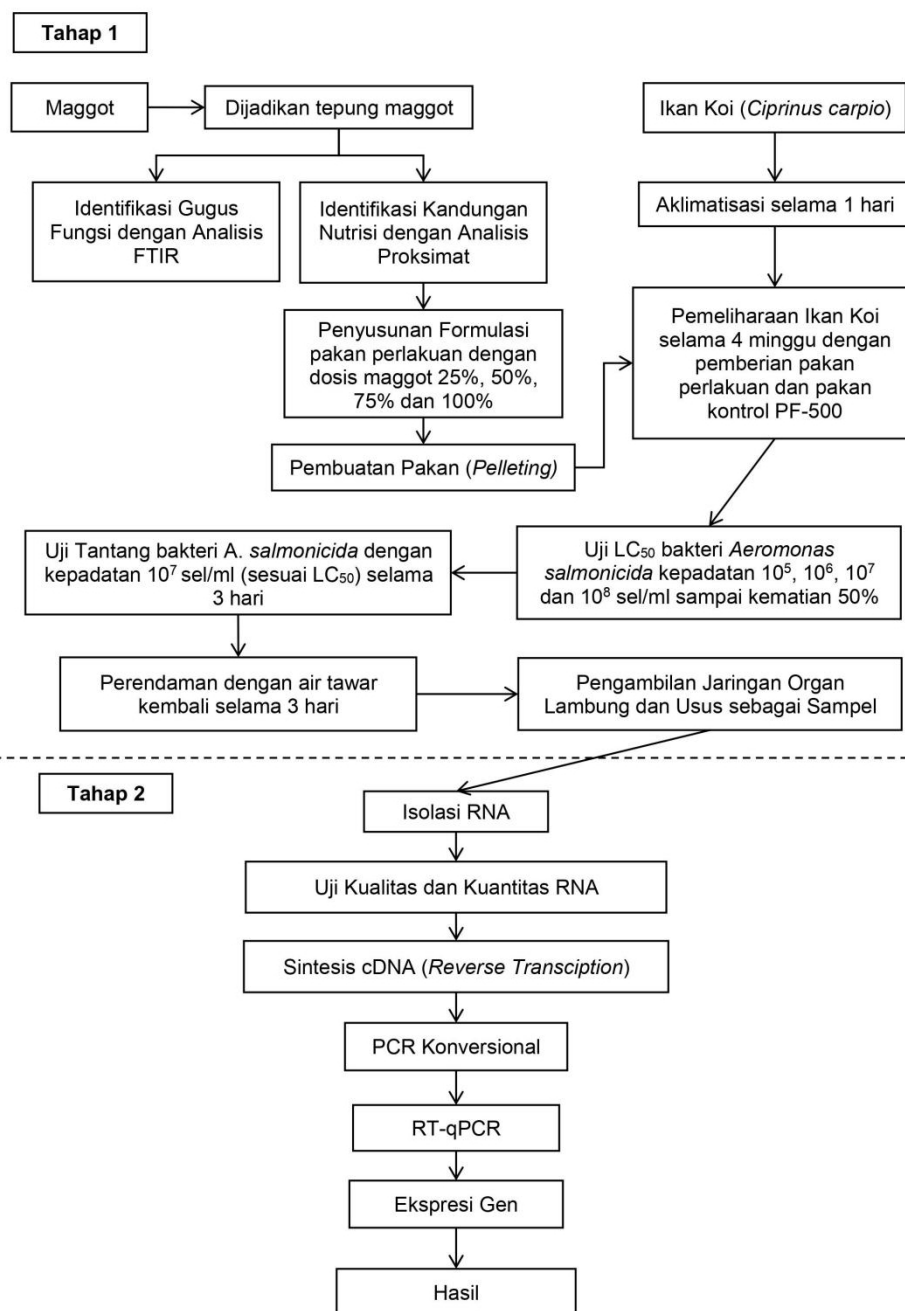
Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

$H_0$  : Diduga pemberian dosis maggot yang berbeda tidak dapat meningkatkan tingkat intensitas gen TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida*

$H_1$  : Diduga pemberian dosis maggot yang berbeda dapat meningkatkan tingkat intensitas gen TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida*

### 3.4 Kerangka Operasional Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep penelitian yang telah dijabarkan, kerangka operasional terdiri dari 2 tahapan yang dilakukan selama penelitian. Secara garis besar tahap pertama adalah persiapan penelitian yang dimulai dari maggot yang hidup dikeringkan hingga menjadi tepung maggot, setelah itu tepung maggot, identifikasi senyawa dengan FTIR dan analisis proksimat. Tahap kedua penelitian ini dimulai dari penyusunan formulasi pakan, pembuatan pakan, pemeliharaan hingga kegiatan di laboratorium dan squence. Selama pemeliharaan, dilakukan pengamatan harian yang meliputi kelulushidupan dan pengukuran kualitas air. Kualitas air yang diuji yaitu pH, suhu dan oksigen terlarut. Adapun prosedur pelaksanaan penelitian yang dijelaskan dalam kerangka operasional penelitian dapat dilihat pada **Gambar 11**, sebagai berikut:



Gambar 10. Kerangka Operasional Penelitian

### 3.5 Kebaharuan Penelitian

Penelitian tentang pemanfaatan maggot untuk mengetahui tingkat intensitas gen pada ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* belum dilakukan sehingga penelitian ini masih tergolong baru karena penelitian yang sudah dilakukan yakni maggot sebagai antibakteri ataupun sebagai



imunostimulan yang mempengaruhi histopatologi dan hematologi (Tabel 1.). Oleh karena itu, Kebaharuan penelitian yang dilakukan ini yaitu Tingkat intensitas gen TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada ikan koi (*C. carpio*) setelah pemberian pakan imunostimulan maggot sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai informasi kedepannya.

**Tabel 1.** Jurnal Penelitian Terkait Pemanfaatan Maggot untuk Meningkatkan Respon Imun Non Spesifik Ikan Koi yang Diinfeksi Bakteri *A. Salmonicida*

No.	Judul	Tahun	Peneliti
1.	Larvae of <i>Hermetia illucens</i> Promotes the Immunocompetence of Haematology and Muscle Histopatology of Common Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Challenged with <i>Aeromonas hydrophila</i> .	2018	Febi Nadhila Nurin, Maftuch, Uun Yanuhar
2.	Potential Protein Source From Black Soldier Fly ( <i>Hermetia Illucens</i> ) Larvae As A Substitution For Fish Meal In Feed Formulation Of Common Carp ( <i>Cyprinus Carpio</i> ).	2019	Ayu Azkiyah Azizah, Arning Wilujeng Ekawati, Happy Nursyam
3.	In Vitro Antibacterial Activity of Black Soldier Fly ( <i>Hermetia Illucens</i> ) Larva Extracts Against Gram-Negative Bacteria.	2020	Harlystiarini, Rita Mutia, I Wayan Teguh Wibawan, and Dewi Apri Astuti.
4.	Pengaruh Pemberian Larva Black Soldier Fly ( <i>Hermetia Illucens</i> ) Terhadap Pertumbuhan Ikan Lele Dumbo ( <i>Clarias Gariepinus</i> ).	2020	Gunaria Siagian
5.	Supplementation of black soldier fly ( <i>Hermetia illucens</i> ) on productivity and blood hematology	2020	Andri Cahya Irawan, Dewi Apri Astuti, I Wayan Teguh Wibawan, Widya Hermana
6.	Effect of partial black soldier fly ( <i>Hermetia illucens</i> L.) larvae meal replacement of fish meal in practical diets on the growth, digestive enzyme and related gene expression for rice field eel ( <i>Monopterus albus</i> )	2020	Yajun Hu, Yanhua Huang, Tao Tang, Lei Tang, Lei Zhong, Wuying Chu, Zhenyan Dai, Kaijian Chen and Yi Hu

### 3.6 Strategi Publikasi

Publikasi karya ilmiah merupakan tahapan setelah pelaksanaan penelitian.

Publikasi dipersyaratkan pada Pelaksanaan Kurikulum Program Magister Budidaya Perairan Fakultas Kelautan dan Perikanan Universitas Brawijaya

adalah Jurnal Nasional terakreditasi dan Jurnal Internasional berindeks scopus.

Adapun rencana publikasi jurnal penelitian dapat dilihat pada **Tabel 2**.

No.	Judul	Jurnal
1.	The Effect of Giving Manggots as Immunostimulants ( <i>Hermetia illucens</i> larvae) on the Expression Gene of TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ in Koi Fish ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Infected by <i>Aeromonas salmonicida</i> bacteria	Research Journal of Life Science





## 4. METODE PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2021 sampai April 2021 di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang), UPT Materia Medica Kota Batu, Laboratorium Kimia Organik (Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang), Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak (Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya) dan Laboratorium Mineral dan Material Maju (Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang).

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan selama kegiatan penelitian antara lain: nampan plastik, *sectio set*, cawan petri, toples 16 liter, *aerator set*, Ember 5 liter, seser, jaring-jaring kawat, oven, blender, saringan, timbangan digital, timbangan analitik, *cool box*, *stopwatch digital*, rak mikrotube, mikropipet, pipa, DO meter, *Tissue lyzer* (JICA ®), Sentrifugasi dingin, Nanodrop spektrofotometer 2000, *Thermal cycler* (Thermo Scientific ®), *Spindown*, *freezer*, Elektroforesis dan kamera.

Bahan-bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian adalah ikan koi (*Cyprinus carpio*), bakteri *Aeromonas salmonicida*, air tawar, Maggot, tepung maggot, pakan komersial, pakan perlakuan, Jaringan organ target, Masker, lateks, Qiazol, Kloroform Isopropanol, etanol 75%, RNase-free water, Mikrotube, *blue tip*, *white tip*, *yellow tip*, Ice Serut, *Master mix*, H<sub>2</sub>O, *RNA template*, *Sterile Distilled Water* (SDW), *Agarose 1% EtBr* dan *5x Loading Dye Buffer*. Alat dan Bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Sedangkan untuk susunan primer yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel**

**2**, sebagai berikut:



**Tabel 2.** Primer Gen TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Forlenza, *et al.*, 2008),  $\beta$ -actin (Tu, *et al.*, 2019) dan primer bakteri *A. salmonicida* (Byers, *et al.*, 2002)

No.	Gen	Direction	Sekuens (5' - 3')	Acc Number
1.	IL-1 $\beta$	Forward	AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT	AJ245635
2.	IL-1 $\beta$	Reverse	CCTGAAGAGGAGGCTGTCA	
3.	TNF $\alpha$	Forward	GCTGTGCTTCACGCTCAA	AJ311800
4.	TNF $\alpha$	Reverse	CCTTGGAGGTGACATTTGCTTTT	
5.	$\beta$ -actin	Forward	GATGCGGAAACTGGAAAGGG	AB039726
6.	$\beta$ -actin	Reverse	ATGAGGGCAGAGTGGTAGACG	
7.	PAAS	Forward	CGT TGG ATA TGG CTC TTC CT	E45Z2E8C013
8.	PAAS	Reverse	CTC AAA ACG GCT GCG TAC CA	

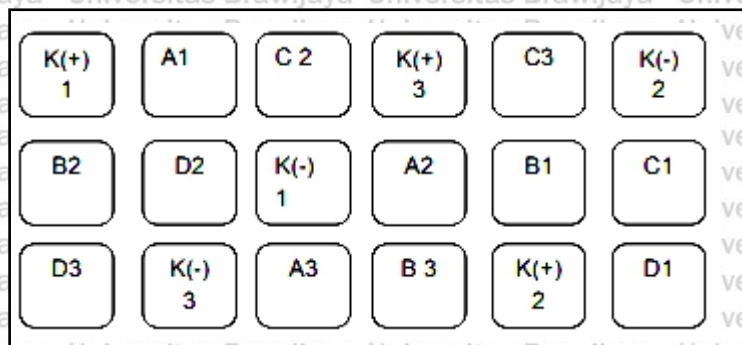
#### 4.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode penelitian deskriptif eksperimen. Metode penelitian deskriptif eksperimen adalah suatu penelitian yang digunakan untuk mendeskripsikan atau menjelaskan suatu kejadian yang ada di lapang, baik kejadian tersebut bersifat ilmiah atau rekayasa dari manusia. Tujuan dari penelitian deskriptif yaitu untuk membuat suatu penjelasan atau lukisan secara sistematis yang menggambarkan kejadian (fakta), sifat-sifat atau hubungan antar kejadian yang sedang diamati dan sedang diteliti oleh seorang peneliti (Setiadi, *et al.*, 2014). Penelitian ini menggambarkan tingkat intensitas gen TNF $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada ikan Koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* setelah pemberian maggot secara jelas dan terperinci.

#### 4.4 Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Sastrosupadi (2002), menjelaskan bahwa Rancangan acak lengkap digunakan pada percobaan yang memiliki kondisi media atau tempat percobaan yang seragam sehingga lingkungan tempat pemeliharaan hewan uji dalam keadaan sama. Denah perlakuan penelitian ini dilihat pada **Gambar 12**.





**Gambar 11.** Denah Perlakuan Penelitian

Keterangan :

- A : Perlakuan pemberian maggot dengan dosisi 25 % dari tepung ikan
- B : Perlakuan pemberian maggot dengan dosisi 50 % dari tepung ikan
- C : Perlakuan pemberian maggot dengan dosisi 75 % dari tepung ikan
- D : Perlakuan pemberian maggot dengan dosisi 100 % dari tepung ikan
- K (+) : Perlakuan kontrol dengan pemberian pakan komersial PF-500 yang diinfeksi bakteri *A. salmonicida*
- K (-) : Perlakuan kontrol dengan pemberian pakan komersial PF-500 tanpa diinfeksi bakteri *A. salmonicida*
- 1, 2, 3 : Ulangan Perlakuan

## 4.5 Prosedur Penelitian

### 4.5.1 Tahap 1

#### a. Sampel Maggot

Maggot yang digunakan dalam penelitian ini berupa maggot hidup yang dibersihkan lalu dibungkus plastik dan diawetkan/dimatikan didalam *freezer* selama 2 hari. Kemudian, maggot dijemur dibawah sinar matahari hingga es mencair. Maggot yang sudah mencair tersebut kemudian di oven dengan suhu kurang dari 50°C selama 3 jam atau sampai maggot kering seperti keripik. Maggot yang sudah dioven kemudian dihaluskan dengan *blender* atau mesin giling agar didapatkan maggot dalam bentuk serbuk, setelah itu diayak hingga menghasilkan serbuk maggot yang berukuran lebih halus. Serbuk ini nantinya akan dijadikan bahan uji FT-IR, analisis proksimat dan digunakan untuk bahan pakan dengan dosis berbeda yang dicampur bahan pakan komersil lainnya untuk dijadikan

pakan perlakuan. Pakan tersebut akan diberikan pada ikan koi selama pemeliharaan.

**b. Identifikasi Senyawa dengan FT-IR**

Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa aktif maggot dapat dilakukan dengan menggunakan 3 tahap yaitu tahap pertama analisis FTIR (*Fourier Transform Infrared*), tahap kedua Uji fitokimia dan yang terakhir analisis spektrofotometer. Identifikasi senyawa dilakukan di Laboratorium Kimia Organik (Fakultas Sains dan Teknologi (Saintek), Universitas Islam Negeri Malang.

Analisis tersebut dilakukan untuk mengetahui hasil akurat senyawa aktif yang terdapat pada maggot sehingga dapat digunakan sebagai informasi yang pasti kedepannya.

**c. Analisis Proksimat**

Serbuk maggot dan bahan-bahan pakan komersial seperti tepung ikan, tepung dedak, tepung kedelai, tapioka, tepung gaplek dll, sebelum dilakukan penyusunan formulasi pakan, perlu dilakukan analisis proksimat. Analisis proksimat dilakukan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya. Bahan yang digunakan sebanyak 20 gram tepung yang sudah diayak.

**d. Pembiakan Bakteri *A. salmonicida***

• **Media Cair TSB (*Trypticase Soy Broth*)**

Media TSB ditimbang sesuai kebutuhan kemudian dilarutkan dalam akuades pada erlenmeyer lalu diadung menggunakan spatula hingga larut sempurna. Setelah itu tutup erlenmeyer menggunakan kapas, aluminium foil, dan plastik wrap. Selanjutnya media TSB disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang sudah disterilisasi dibiarkan hingga mencapai suhu ruang. Bakteri akan dibiakkan akan mati jika diinokulasi pada media dengan suhu tinggi.



- **Media Padat TSA (*Tripticase Soy Agar*)**

Media TSA dengan dosis 40 gram/L disiapkan, kemudian dilarutkan dalam akuades pada erlenmeyer. Selanjutnya media TSA dihomogenkan dan dipanaskan diatas *hotplate*. Setelah media homogen erlenmeyer ditutup menggunakan kapas, alumunium foil, dan plastik wrap. Media yang sudah tertutup kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah media selesai disterilisasi dibiarkan hingga tidak terlalu panas namun media tetap dalam kondisi cair. Media yang sudah tidak terlalu panas dituang pada cawan petri lalu tunggu hingga menjadi. Perlu diperhatikan jangan sampai terdapat banyak uap air pada cawan petri.

- **Pembiakan Bakteri pada Media TSB**

Media terlebih dahulu disiapkan dalam erlenmeyer, lalu jarum ose dipanaskan diatas bunsen hingga berpijar tujuannya agar jarum steril. Sentuhkan jarum ose pada media kosong di media biakan murni supaya jarum ose tidak dalam kondisi panas saat menyentuh biakan murni. jarum ose disentuh pada biakan murni baktri *A. salmonicida* lalu dicelupkan pada media TSB. Kemudian media TSB diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 12-24 jam.

- **Pembiakan Bakteri pada Media TSA**

Media TSA dalam cawan petri terlebih dahulu disiapkan. Selanjutnya jarum ose disterilisasi diatas bunsen hingga berpijar. Jarum ose yang masih panas disentuh pada media kosong di media biakan murni supaya jarum ose tidak panas sehingga tidak membunuh bakteri yang akan diinokulasi. Selanjutnya jarum ose disentuh pada biakan murni bakteri *A. salmonicida* dan digoreskan pada media TSA secara zig-zag. Media TSA yang sudah digores kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 24°C selama 24 jam.



e. **Lethal Concentration 50% (LC<sub>50</sub>) Bakteri *A. salmonicida***

Uji LC<sub>50</sub> dilakukan untuk mengetahui level konsentrasi infeksi bakteri *A. salmonicida* terhadap ikan uji. Menurut Noerbaeti (2019) LC<sub>50</sub> merupakan uji untuk menentukan pada konsentrasi berapa bakteri dapat mematikan 50% dari organisme uji yang dapat diestimasi dengan grafik dan perhitungan atau pada suatu waktu pengamatan tertentu. Pada penelitian ini kepadatan yang digunakan dalam uji LC<sub>50</sub> yaitu 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, dan 10<sup>8</sup> sel/ml.

**4.5.2 Tahap 2**

a. **Pembuatan Pakan**

Pemberian imunostimulan maggot dalam bentuk tepung yang ditambahkan ke dalam tepung pakan komersial, yang selanjutnya dijadikan pellet. Sebelum itu, menghitung dan menyusun formulasi pakan penelitian berdasarkan hasil analisis proksimat serbuk maggot, tepung ikan dan bahan tepung pakan komersial lainnya. Dosis tepung maggort yang diberikan berbeda-beda setiap perlakuan, antara lain perlakuan A 25% dari tepung ikan (terdiri dari 25% magot dan 75% tepung ikan), perlakuan B 50% dari tepung ikan (terdiri dari 50% tepung ikan dan maggot), perlakuan C 75% dari tepung ikan (terdiri dari 75% maggot dan 25% tepung ikan), perlakuan D 100% dari tepung ikan (terdiri dari 100% maggot dan 0% tepung ikan) dan perlakuan Kontrol diberikan pakan komersial PF-500. Formulasi Pakan Acuan yang digunakan dalam pembuatan Pakan perlakuan dapat dilihat pada **Lampiran**

**4.**

Setelah penyusunan formulasi (**Lampiran 4.**) dilanjutkan penimbangan bahan-bahan pakan sesuai dengan formulasi pakan tiap perlakuannya (**Tabel 3.**).

Kemudian dicampurkan sampai homogen. Pencampuran bahan dimulai dercampur rata, tambahkan air hangat untuk memadatkan. Kemudian bahan dari bahan yang sedikit dicampur dengan bahan yang lebih banyak. Setelah ti cetak



dan dikeringkan anginkan dengan cara dipanaskan dibawah sinar matahari sampai pakan kering.

**Tabel 3.** Berat Bahan Pakan Tiap Perlakuan per 500 gr

BAHAN DASAR	PERLAKUAN MAGGOT (gr)				BERAT TOTAL (gr)
	25%	50%	75%	100%	
T. Ikan	112,5	74,5	37,5	0	224,5
T. Kedelai	135	135	135	135	540
T. Maggot	38	77	115	154	384
T. Gaplek	65	65	65	65	260
Dedak (Katul)	75	75	75	75	300
T. Tapioka	44	47	50	53	194
Minyak ikan	15,5	11,5	7,5	3	37,5
Vit & Mineral MIX	15	15	15	15	60
<b>TOTAL</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>2.000</b>

#### b. Pemeliharaan Ikan

Sampel ikan koi (*Cyprinus carpio*) strain chagoi yang diambil dari Pasar Ikan Punten, Kabupaten Batu yang berukuran 7-10 cm dalam kondisi sehat. Sebelum itu, menyiapkan wadah pemeliharaan ikan berupa bak 5 liter sebanyak 15 buah dengan kepadatan ikan 10 ekor/bak, kemudian ikan tersebut diaklimatisasi selama 3 hari. Selama proses aklimatisasi, ikan dipuasakan tidak diberi pakan terlebih dahulu selama 2 hari. Setelah diaklimatisasi selanjutnya dipelihara selama 4 minggu, dengan pemberian pakan imunostimulan dengan FR 5% dari biomassa ikan sebanyak 3 kali sehari secara adlibitum. Ikan yang sudah dipelihara selama 4 minggu, kemudian diuji tantang dengan bakteri *A. salmonicida* pada kepadatan bakteri yang diperoleh  $LC_{50}$ . Ikan diinfeksi dengan cara di rendam selama 3 hari, kemudian direndam lagi di air tawar lagi selama 3 hari.

#### c. Penginfeksian Bakteri *A. salmonicida*

Bakteri *A. salmonicida* dari Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta, dengan kepadatan awal  $10^{14}$  sel/ml. Pada pengukuran kepadatan bakteri dengan menggunakan spektrofotometer diketahui bahwa kepadatan bakteri yaitu . sedangkan, untuk

mendapatkan kepadatan yang diinginkan yaitu  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  dan  $10^8$  sel/ml dilakukan dengan pengenceran menggunakan rumus:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan:

N1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media TSB (sel/ml)

N2 : kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V1 : Volume suspensi bakteri dalam media TSB yang dibutuhkan

V2 : Volume yang diinginkan

#### 4.6 Parameter Utama

##### 4.6.1 Survival Rate

Selama pemeliharaan ikan koi (*C. carpio*) pada penelitian ini dilakukan pengamatan kelulushidupan. Menurut Saputra, *et al.* (2013), cara menentukan kelangsungan hidup ikan yang dipelihara dengan membandingkan jumlah ikan yang hidup pada akhir pemeliharaan dengan jumlah ikan pada awal tebar. Tingkat kelangsungan hidup ikan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan:

SR : Kelangsungan hidup (%)

N<sub>t</sub> : Jumlah Ikan akhir pemeliharaan (ekor)

N<sub>0</sub> : Jumlah ikan awal pemeliharaan (ekor)

##### 4.6.2 Analisis tingkat Integritas Gen

###### a. Ekstraksi RNA

Ikan yang sudah diinfeksi bakteri *A. salmonicida*, diambil pada jaringan lambung dan usus pada semua ikan perlakuan, ikan kontrol positif dan ikan sehat. Hal ini dikarenakan jaringan lambung dan usus merupakan jaringan yang mengalami kerusakan saat ikan diinfeksi bakteri *A. salmonicida*. Jaringan tersebut digunakan sebagai sampel uji.



Semua kegiatan dibawah dilakukan menggunakan Teknik aseptik dalam suhu dingin. RNA diekstraksi dengan menggunakan *kit Acid Guardine Phenol Chloroform* (AGPC), dari jaringan yang masih fresh. Sampel jaringan usus sebanyak 25 mg dimasukkan ke dalam mikrotube 2 ml, tambahkan 500  $\mu$ l *Qiazol* (Qiagen ®). Sampel di destruksi menggunakan *tissue lyzer* (JICA ®) hingga tidak ada bagian jaringan yang tampak utuh. Tambahkan lagi 500  $\mu$ l *QIAZOL*, kemudian dihomogenkan pelan-pelan sebanyak 15x dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Tambahkan 200  $\mu$ l *klorofoam*, kemudian dihomogenkan kuat-kuat selama 15 detik. Inkubasi dalam suhu ruang selama 2-3 menit. Lalu, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Setelah disentrifugasi akan terbentuk 3 lapisan, kemudian pindahkan lapisan bening paling atas ke dalam mikrotube baru 1,5 ml. Selanjutnya ditambahkan 500  $\mu$ l isopropanol dan dihomogenkan kuat-kuat sebanyak 15x. inkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit.

Hasil sentrifugasi kemudian diamati keberadaan pelet putih pada bagian dasar tabung. Supernatan dibuang secara pelan-pelan, kemudian pelet dicuci menggunakan etanol 75% sebanyak 1 ml secara pelan-pelan di dinding. Selanjutnya disentrifugasi lagi dengan kecepatan 7.500 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan etanol dibuang, kemudian pellet dikering anginkan selama 10 menit, lalu ditambahkan 50  $\mu$ l RNase-free water untuk melarutkan RNA. Diamkan hingga pellet berubah menjadi gel, kemudian dimixer dan RNA siap digunakan.

#### **b. Pengukuran Kualitas, Kuantitas dan Integritas RNA**

Hasil isolasi RNA diukur kualitas dan kuantitasnya menggunakan nanodrop spectrofotometer 2000. kualitas RNA diketahui dengan melihat angka pada kolom rasio panjang gelombang 260/280, apabila angka rasio berkisar antara 1,8-2,0,



maka RNA yang diisolasi memiliki kualitas baik dan dapat dilanjutkan ke proses sintesis cDNA. Integritas RNA dilihat menggunakan elektroforesis standar menggunakan agarose, QSigma QALdrich ®. 1 ml sampel dicampur dengan 0,5 ml 5x Loading Dye Buffer, Intron ® dan 1,5 ml Sterile Distilled water (SDW). Sampel di elektroforesis menggunakan Agarose 1% EtBR dan 0,5 TBE-EtBR selama 60 menit dalam tegangan 50 volt. Kemunculan 2 band pada hasil elektroforesis (28srRNA, 16srRNA dan 5sRNA) menunjukkan integritas RNA yang baik dan dapat dilanjutkan ke proses sintesis cDNA.

### c. Sintesis cDNA

Sintesis cDNA menggunakan *TOYOBO Reverse Transcription KIT* dimulai dengan menyiapkan mikrotube sejumlah sampel dan diberi kode sampel. Kemudian dibuat master mix dengan mencampurkan 4x *DN Master Mix* dan *gDNA Remover* dalam perbandingan volume 50:1. Selanjutnya dibuat *RT - PCR cocktail* dengan komposisi terdiri dari 2 µl *Master Mix* dan 2 µl H<sub>2</sub>O per 1 sampel. *RNA template* sebanyak 4 µl dimasukkan kedalam mikrotube berukuran 200 µl, kemudian diinkubasi terlebih dahulu dalam mesin *thermal cycler* (Thermo ®) dengan suhu 65°C selama 5 menit sebelum dicampur ke dalam *RT- PCR cocktail*. Tambahkan *RT-PCR cocktail* kedalam mikrotube sebelumnya, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Selanjutnya, ke dalam PCR cocktail ditambahkan 2 µl *5X RT Master Mix* lalu diinkubasi lagi untuk membalik RNA ke cDNA melalui 3 tahap. Adapun tahapan tersebut dimulai dengan suhu 37°C selama 15 menit, dilanjutkan dengan proses sintesis cDNA pada suhu 50°C selama 5 menit, dan 98°C selama 5 menit. Sampel yang telah menjalani proses reverse transcription disimpan di freezer.

### d. RT-qPCR

Semua kegiatan dibawah dilakukan menggunakan Teknik aseptik dalam suhu dingin. Sampel cDNA diencerkan dengan konsentrasi akhir sebesar 100 ng/ µl.



Kemudian, dibuat *cocktail master mix* dengan komposisi terdiri dari 2  $\mu\text{l}$  *Luna Universal Sybr Green Master mix*, 0,5  $\mu\text{l}$  *Primer Forward*, 0,5  $\mu\text{l}$  *Primer Reverse*, 1  $\mu\text{l}$  *cDNA sampel* dan 16  $\mu\text{l}$  *Nuclease Free Water*. qPCR dilakukan dengan 2 siklus yang terdiri dari: Inisial denaturasi pada suhu 95°C selama 60 detik, Denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik dan Ekstensi pada suhu yang sesuai dengan  $T_m$  primer gen target selama 30 detik. Siklus diulang sebanyak 40-45 kali. *Melt curve* dilakukan menggunakan resolusi suhu 1°C dengan waktu *hold* sebesar 5 detik/step. Kurva standar untuk penentuan threshold dibuat dengan menggunakan pengenceran sampel dengan pengenceran berseri  $10^{-1}$ .

Tingkat intensitas gen sitokin diukur dengan *quantitative real time* RT-PCR (Applied Biosystems) menggunakan SYBR *Green select reaction mix* (Applied Biosystems) sesuai petunjuk dari pembuat kit. Sebelum dilakukan pengukuran dengan *quantitative real time* RT-PCR, RNA hasil ekstraksi dari jaringan organ dilakukan transkripsi balik (*reverse transcription*). Hasil cDNA yang didapat digunakan sebagai cetakan (*template*) pada pengukuran dengan *quantitative real time* RT-PCR menggunakan SYBR *Green select reaction mix* dan sepasang primer masing-masing gen, yaitu primer forward dan primer reverse. Kondisi reaksinya adalah tahap pertama suhu 50°C selama 2 menit, tahap kedua suhu 95°C selama 2 menit, tahap ketiga yaitu dengan suhu 95°C selama 15 detik dan tahap terakhir suhu 60°C selama 1 menit sebanyak 35 siklus. Sebagai gen normalisasi, digunakan gen endogenous/housekeeping yakni beta actin ( $\beta$ -actin). Pengukuran dilakukan 2 kali ulangan dengan menyertakan kontrol tanpa cetakan cDNA (Warnasih, et al., 2014).

#### 4.6.3 Deteksi Molekuler

Deteksi molekuler dilakukan menggunakan metode elektroforesis. Hasil amplifikasi DNA diperiksa menggunakan elektroforesis dimulai dari penimbangan agarose sebesar 1,5% dan dimasukkan kedalam erlenmeyer lalu ditambahkan 25



mL TAE (*Tris Asetat EDTA*) dan dipanaskan dengan *microwave*. Agarose dididamkan hingga hangat kuku ( $\pm 50^{\circ}\text{C}$ ) dan ditambahkan Cybr Green sebanyak 2  $\mu\text{L}$  yang telah dicampur dengan loading dye sebagai pemberat dengan cara pipeting. Setelah itu agarose dituang ke dalam elektroforesis chamber (cetakan), sisir dipasang dan dibiarkan mengeras  $\pm 20$  menit. Setelah agarose mengeras sisir dilepaskan dan ditambahkan TAE buffer hingga gel agarose terendam.

Kemudian masukkan amplicon hasil PCR kedalam lubang/sumur pada gel agarose dengan cara pipeting yang dimana urutan lubangnya yaitu, marker, kontrol positif, kontrol negatif dan perlakuan sampel uji secara perlahan dan hati-hati.

Lubang-lubang dalam gel diisi secara berurutan dengan penanda Tangga DNA 100 bp (Geneaid, Nexmark), 8  $\mu\text{L}$  amplifikasi, dan kontrol kosong. Produk PCR dianalisis pada gel agarosa 1,5% yang mengandung 0,5  $\text{mg.mL}^{-1}$  *ethidium bromide* dalam 1X *Tris Acetate-EDTA* (TAE) buffer dan ukurannya diperkirakan dengan perbandingan dengan 100 bp Tangga DNA invitrogen. Proses elektroforesis dilakukan selama 45 menit dengan tegangan 100 volt. Gel ditempatkan dalam dokumentasi gel, diamati di bawah sinar UV, dan didokumentasikan. Alat untuk mengambil gambar elektroforesis adalah alat Pencitraan Sistem BioDoc.

#### 4.7 Parameter Penunjang

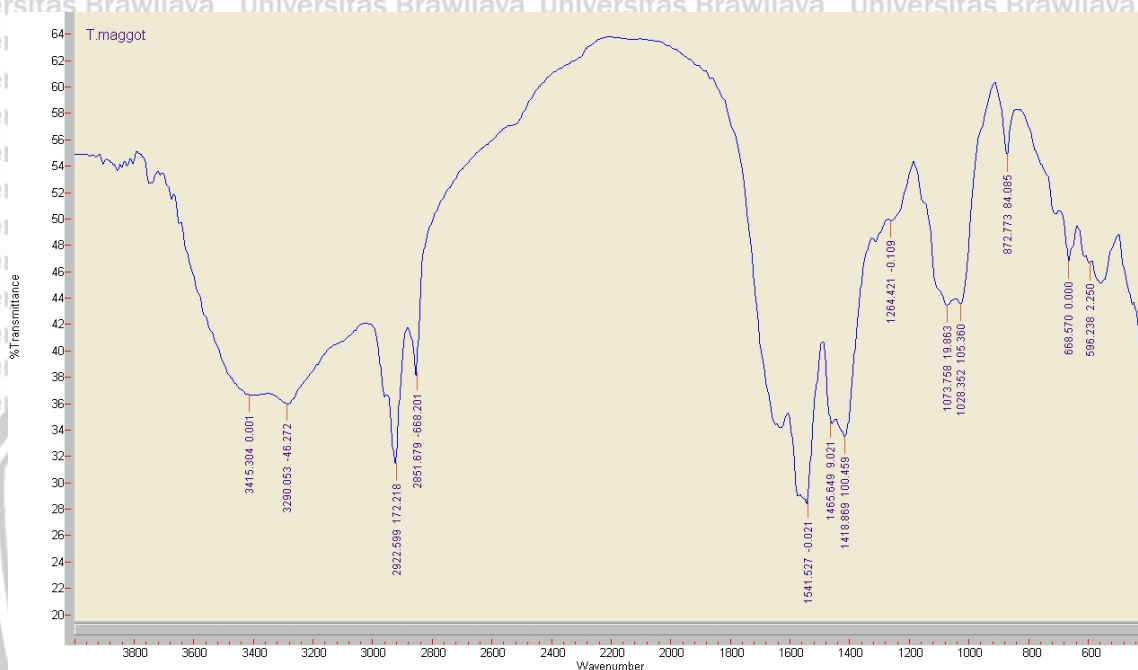
Selain parameter utama yang telah dijelaskan sebelumnya, pada penelitian ini juga terdapat beberapa parameter penunjang yang akan diukur selama pemeliharaan ikan mas koi yang mana meliputi kelulushidupan ikan dan pengukuran kualitas air seperti suhu, pH, dan DO (oksigen terlarut).



## 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Uji Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) Maggot

Pada Uji FTIR tepung maggot didapatkan 14 daerah frekuensi yang menunjukkan jenis ikatan dalam senyawa.



Gambar 13. Hasil FT-IR Tepung Maggot

Hasil spektrum inframerah maggot pada Gambar 13. menunjukkan adanya ikatan O-H pada bilangan gelombang  $3415.304\text{ cm}^{-1}$  dan  $3290.053\text{ cm}^{-1}$ . Ikatan C-H ditunjukkan pada bilangan gelombang  $2922.599\text{ cm}^{-1}$ ,  $2951.679\text{ cm}^{-1}$ ,  $872.773\text{ cm}^{-1}$ , dan  $668.570\text{ cm}^{-1}$ . Pada bilangan gelombang  $1465.649\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya fenol kemudian pada  $1076.553\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus fungsi C-OH. Fenol juga berada pada bilangan gelombang  $669.272\text{ cm}^{-1}$  dan  $696.396\text{ cm}^{-1}$ . Menurut Skoog et al., (1998) pada panjang gelombang  $3446.497\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus fungsi O-H dan amonia primer, pada panjang gelombang  $2937.913\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus fungsi  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ , C-OOH, dan ammonia, pada panjang gelombang  $1640.624\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus fungsi fenol dan amino primer,

pada panjang gelombang 1076.553 menunjukkan adanya gugus fungsi  $\text{CH}_2\text{OH}$  dan amino, sedangkan pada panjang gelombang 669.272 dan 696.396

menunjukkan adanya gugus fungsi fenol dan amino primer.

Hasil analisis di atas, spektrum inframerah maggot diketahui mengandung gugus O-H, C-H, C-OH, dan senyawa fenol (**Tabel 5**). Hal ini sesuai dengan hasil

penelitian Nugraha, Prasetya, dan S, Mursiti (2017) bahwa pada isolat flavonoid

ini menunjukkan adanya gugus fungsi O-H, C=O, C=C, C-H, C-OH, dan C-O

menandakan bahwa isolat ini positif mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid

merupakan golongan bahan alami dengan struktur penyusun utamanya fenolik.

Komponen tersebut memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan yaitu terkait

dengan sifat antioksidatif, antiinflamasi, antimutagenik dan antikarsinogenik

sehingga berpotensi dapat meningkat sistem imun dalam tubuh (Fitri dan Putra,

2021).

**Tabel 4.** Hasil FT-IR Tepung Maggot

Panjang Gelombang	Gugus Fungsi
3415.304	Gugus O-H
3290.053	Gugus O-H
2922.599	Gugus C-H
2951.679	Gugus C-H
1541.527	Gugus C=O
1465.649	Gugus Phenol
1418.869	Gugus Phenol
1264.421	C-OH
1073.758	C-OH
1028.352	Alkil halide
872.773	C-H
668.570	C-H
596.238	Alkil halide
419.400	Alkil halide

## 5.2. Uji Lethal Concentration 50% ( $\text{LC}_{50}$ )

Berdasarkan uji  $\text{LC}_{50}$  didapatkan kepadatan bakteri yang mengakibatkan kematian sebesar 50% populasi ikan koi (*C. carpio*) selama 96 jam adalah bakteri

*A. salmonicida* dengan kepadatan  $10^7$  sel/ml.



**Tabel 5.** Hasil *Lethal Concentration 50%* (LC<sub>50</sub>) Bakteri *A. salmonicida*

Jumlah Ikan Mas yang Masih Hidup					
Jam Ke-		10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
24		9	10	10	9
48		8	8	9	7
72		6	7	7	5
96		3	4	5	2
Persentase		30%	40%	50%	20%

Berdasarkan **Tabel 5.** diperoleh hasil LC<sub>50</sub> bakteri *A. salmonicida* yaitu pada perlakuan perendaman bakteri menggunakan kepadatan bakteri 10<sup>7</sup> sel/ml pada jam ke 96. Sehingga yang digunakan pada penelitian ini yakni perendaman bakteri dengan lama waktu 96 jam. Hal ini sesuai dengan pendapat Retnoningsih *et al.* (2009), bakteri dengan kepadatan 10<sup>7</sup> sel/ml dalam waktu 96 jam yang digunakan, menyebabkan ikan mas sudah mati. Keadaan ikan yang sakit dipengaruhi oleh tiga unsur, yaitu virulensi pathogen, jumlah pathogen, dan ketahanan inang.

### 5.3. Tingkat Intensitas Gen

Analisis Tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  pada penelitian ini menggunakan metode RT-qPCR. Dimana metode tersebut memiliki berbagai keunggulan, yaitu amplifikasi atau perbanyakan fragmen DNA yang dapat diamati seketika (secara *realtime*), dapat menentukan konsentrasi target molekul DNA hasil amplifikasi dan juga dapat mendeteksi dengan tingkat kontaminasi 1%. Walau demikian, untuk mencegah adanya kegagalan saat analisis tingkat intensitas gen diperlukan pengujian kemurnian dan konsentrasi sampel terlebih dahulu dengan menggunakan spektrofotometer nanodrop untuk memastikan kemurnian dan konsentrasi yang sampel RNA dan cDNA dalam kondisi baik dan tidak terkontaminasi.



**Tabel 6.** Hasil Nanodrop sampel organ Lambung dan Usus ikan Koi (*C. carpio*)

No.	Sampel	RNA				cDNA			
		ng/ul		A260/280		ng/ul		A260/280	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	K (-) Lambung	14690.2	1817.7	1.53	1.92	830.71	826.54	1.95	1.97
2	K (-) Usus	9732.1	12879.1	1.94	1.81	812.76	782.41	1.96	1.96
3	K (+) Lambung	11636.9	8429.0	1.75	1.94	800.54	102.19	1.96	1.95
4	K (+) Usus	4393.3	7518.8	1.76	1.95	940.39	863.83	1.96	1.95
5	A (25%) Lambung	8876.1	12378.3	1.80	1.57	843.99	892.16	1.94	1.94
6	A (25%) Usus	8886.8	8937.9	1.82	1.84	960.69	781.14	1.94	1.94
7	B (50%) Lambung	4582.0	12817.3	1.67	1.67	847.40	845.50	1.95	1.94
8	B (50%) Usus	3643.5	8766.55	1.78	1.82	854.85	759.17	1.94	1.94
9	C (75%) Lambung	7962.2	3002.2	1.82	1.80	980.60	814.48	1.94	1.96
10	C (75%) Usus	3776.3	2150.2	1.78	1.79	572.66	908.54	1.96	1.95
11	D (100%) Lambung	3451.4	13158.4	1.84	1.47	803.72	1083.86	1.96	1.93
12	D (100%) Usus	10091.4	7939.9	1.74	1.79	729.08	746.43	1.95	1.96

Keterangan: A260/280 (Kemurnian) dan Ng/ul (Konsentrasi)

Hasil uji kemurnian dan konsentrasi sampel RNA dan cDNA menunjukkan bahwa sampel dalam kondisi murni dan tidak terkontaminasi (Tabel 7.). Nilai konsentrasi yang didapat pada lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) rata-rata > 500 ng/μL. Nilai konsentrasi tertinggi pada sampel RNA lambung yaitu pada perlakuan kontrol negatif atau ikan sehat sebesar 14690.2 ng/μL dan terendah pada perlakuan C sebesar 3002.2 ng/μL. Nilai konsentrasi tertinggi pada RNA usus yaitu pada perlakuan ikan sehat sebesar 12879.1 ng/μL dan terendah pada perlakuan C sebesar 2150.2 ng/μL. Sedangkan, pada sampel cDNA lambung tertinggi pada perlakuan D sebesar 1083.86 ng/μL dan terendah pada perlakuan kontrol positif sebesar 102.19 ng/μL. Nilai konsentrasi pada sampel cDNA usus tertinggi pada perlakuan A sebesar 960.69 ng/μL dan terendah pada perlakuan C sebesar 572.66 ng/μL. Batas minimal konsentrasi yang dapat digunakan yaitu sebesar 65 ng/μL. Sehingga dengan nilai konsentrasi sampel RNA dan DNA tersebut memiliki rantai nucleotide yang cukup panjang dan dapat dilanjutkan ke tahap mengukur intensitas gen.

Sedangkan, nilai kemurnian RNA dan cDNA tersebut juga mencukupi standart pengujian, dimana nilai kemurnian yang didapat rata-rata diatas 1,7, walaupun terdapat beberapa sampel dibawah 1,8 namun tidak terlalu jauh dan



masih bisa digunakan. Sampel yang dikatakan murni apabila memiliki nilai perbandingan absorbsansi 260/280 nm berkisar 1,78-2,0. Hal ini sesuai dengan pendapat Andriyani, *et al.* (2020), bahwa kemurnian DNA/RNA yang baik adalah  $A_{260/280} \geq 1.8$ . nilai kemurnian tersebut membuktikan bahwa DNA/RNA yang didapat dinyatakan murni tanpa adanya kontaminasi senyawa lain seperti protein.

### 5.3.1. Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- $\alpha$ )

Hasil perbandingan Intensitas (%) gen sitokin TNF- $\alpha$  setiap perlakuan pada organ lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* ditampilkan pada **Tabel 8**. Hasil tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  pada organ lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* dan kontrol dengan 2 ulangan. Ikan kontrol memiliki intensitas TNF- $\alpha$  lebih kecil dibandingkan dengan ikan yang perlakuan pakan imunostimulan baik pada organ lambung ataupun usus.

**Tabel 7.** Hasil Tingkat Intensitas Gen TNF- $\alpha$  pada ikan Koi (*C. carpio*)

No	Sampel	Intensitas TNF- $\alpha$		
		Ulangan 1	Ulangan 2	Rata-rata
1	K (-) Lambung	30,0074745	28,6120442	29,3097593
2	K (-) Usus	27,0481604	27,5336288	27,2908946
3	K (+) Lambung	27,3589345	29,3470714	28,3530029
4	K (+) Usus	33,1591272	28,6216446	30,8903859
5	A (25%) Lambung	28,8376483	34,1285049	31,4830766
6	A (25%) Usus	36,7045538	32,6567557	34,6806547
7	B (50%) Lambung	32,5352338	31,7801788	32,1577063
8	B (50%) Usus	34,2975588	29,9623573	32,1299581
9	C (75%) Lambung	33,5685355	32,4831366	33,0258361
10	C (75%) Usus	31,2259915	33,1591272	32,1925594
11	D (100%) Lambung	31,4705442	36,0058162	33,7381802
12	D (100%) Usus	33,3731607	31,6784240	32,5257924

Hasil Tingkat intensitas gen sitokin pada organ Lambung ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* (**Tabel 7.**). Pada penelitian ini, menunjukkan bahwa ikan sehat ataupun ikan yang terinfeksi bakteri tanpa perlakuan memiliki tingkat intensitas TNF- $\alpha$  lebih rendah jika dibandingkan dengan ikan perlakuan pakan maggot. Pada organ lambung ikan sehat memiliki intensitas sebesar 30,08% dan 28,61% pada ulangan 1 dan 2. Pada ikan yang kontrol positif atau



ikan yang terinfeksi tanpa pemberian pakan perlakuan imunostimulan memiliki intensitas sebesar 27,36% dan 29,35%. Pada ikan perlakuan A yaitu ikan yang terinfeksi bakteri *A. salmonicida* dengan pemberian pakan imunostimulan maggot 25% dari tepung ikan, yang memiliki intensitas gen TNF- $\alpha$  sebesar 28,84% dan 34,13%. Pada ikan perlakuan B dengan pakan dosis maggot 50% dari tepung ikan memiliki intensitas gen pada lambung sebesar 32,54% dan 31,78%. Pada ikan perlakuan C dengan dosis 75% memiliki intensitas gen 33,57% dan 32,48% pada lambung. Dan pada perlakuan D dengan dosis 100% maggot memiliki tingkat intensitas yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan B dan C yaitu sebesar 31,47% dan 36,065.

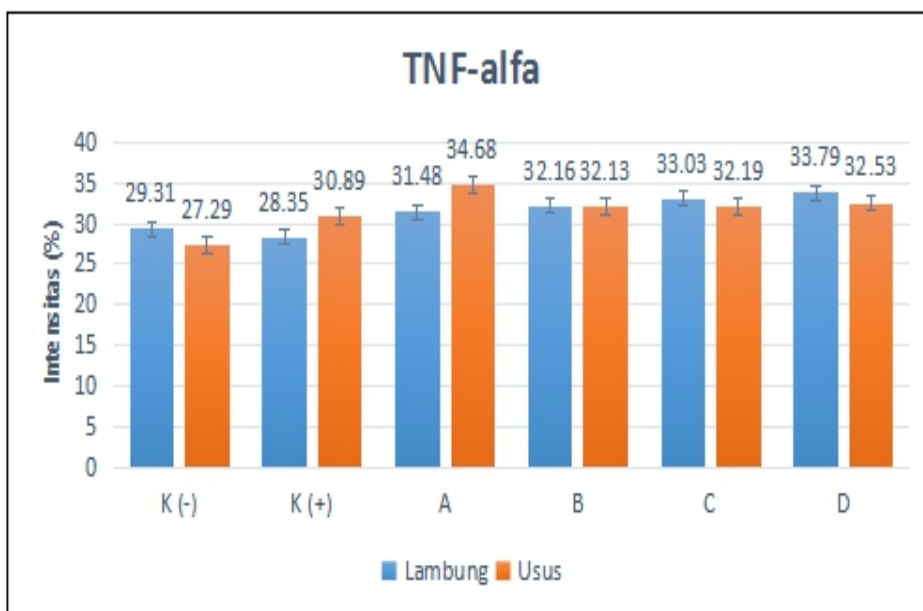
TNF- $\alpha$  merupakan sitokin utama yang merespon saat terjadinya inflamasi akut terhadap adanya bakteri Gram negatif dan mikroba lainnya. Setelah terjadinya infeksi yang masuk ke dalam tubuh dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang dapat menimbulkan reaksi sistematis (Supit, *et al.*, 2015). TNF- $\alpha$  diproduksi oleh makrofag, monosit, polimorfonuklear leukosit, sel otot polos dan sel mast, sehingga akan mengalami peningkatan aktivitas gen saat terjadi reaksi inflamasi untuk merespon infeksi parasit, virus dan bakteri yang masuk ke dalam tubuh (Zhang, *et al.*, 2007).

Sedangkan hasil tingkat intensitas gen sitokin pada organ usus ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* pada ikan sehat memiliki tingkat intensitas TNF- $\alpha$  yang lebih rendah dibanding ikan kontrol positif dan ikan perlakuan (Tabel 7.). Pada usus Ikan sehat memiliki intensitas TNF- $\alpha$  sebesar 27,05% dan 27,53%. Pada ikan yang kontrol positif atau ikan yang terinfeksi tanpa pemberian pakan perlakuan imunostimulan memiliki intensitas masing-masing pada organ usus sebesar 33,16% dan 28,62%. Pada perlakuan A dengan dosis maggot 25% memiliki intensitas gen pada usus sebesar 36,70% dan 32,66%. Pada perlakuan B dengan perlakuan 50% maggot memiliki tingkat



intensitas yang lebih rendah dibandingkan perlakuan A yaitu sebesar 34,30% dan 29,96%. Pada perlakuan C organ usus memiliki intensitas gen TNF- $\alpha$  sebesar 31,23% dan 33,16%. Sedangkan, pada perlakuan terakhir pada perlakuan D dengan dosis maggot 100% dari tepung ikan memiliki intensitas sebesar 33,37% dan 31,68%.

TNF- $\alpha$  bertanggung jawab terhadap kerusakan mukosa pada usus. Hal ini dikarenakan gen sitokin ini bersifat pleotropik yang dapat merangsang inflamasi dan memberi tanda apoptosis sel (Rosalina, 2007). Selain itu, TNF- $\alpha$  berperan penting dalam respon inflamasi sitokin menginduksi kuat dari beberapa tanda respon jalur inflamasi saat adanya bakteri, virus atau mikroba lainnya (Zhang, *et al.*, 2007). Sumber utama TNF- $\alpha$  adalah fagositosis mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen saat masuk kedalam tubuh, sel NK dan sel Mast. Makrofag dirangsang oleh lipopolisakarida untuk mensekresi TNF- $\alpha$  saat adanya antigen yang masuk ke dalam tubuh (Supit, *et al.*, 2015).



**Gambar 14.** Rata-rata Hasil Tingkat Intensitas Gen TNF- $\alpha$  pada organ lambung dan usus ikan Koi (*C. carpio*)

Adapun grafik rerata intensitas gen TNF- $\alpha$  pada organ lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* dari 2 ulangan dapat dilihat pada **Gambar 14**. Grafik diatas menunjukkan hasil rata-rata tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  pada organ lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) disetiap perlakuan. Pada grafik tersebut terlihat bahwa tingkat ekspresi gen TNF- $\alpha$  pada ikan sehat memiliki tingkat intensitas yang paling rendah dibandingkan dengan perlakuan ikan lainnya baik pada organ lambung ataupun usus. Pada lambung ikan sehat memiliki intensitas sebesar 29,31% dan pada usus sebesar 27,29%.

Jika, dibandingkan dengan tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  pada ikan sakit atau ikan kontrol positif terpapar bakteri *A. salmonicida* tanpa pemberian pakan maggot, intensitas TNF- $\alpha$  pada organ lambung memiliki tingkat yang lebih rendah dibandingkan ikan sehat yaitu sebesar 28,35, sedangkan pada usus memiliki tingkat intensitas yang lebih tinggi dibandingkan ikan sehat yaitu sebesar 30,89%. Walaupun demikian, tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  pada ikan kontrol positif memiliki tingkat yang lebih rendah jika dibandingkan dengan ikan perlakuan pemberian pakan yang memanfaatkan maggot sebagai imunostimulan. Pada perlakuan A dengan dosis pemberian maggot 25% memiliki tingkat intensitas tertinggi pada usus sebesar 34,68% dan tingkat intensitas terendah pada lambung sebesar 31,48% jika dibandingkan dengan tingkat intensitas perlakuan pakan lainnya. Walau demikian, pada perlakuan A memiliki tingkat intensitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan ikan sehat dan ikan kontrol positif.

Pada perlakuan B dengan dosis pemberian maggot 50% memiliki tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  yang hampir sama dikedua organ yang diamati yaitu sebesar 32,16% pada lambung dan 32,13% pada usus. Pada perlakuan C dengan dosis pemberian maggot 75% memiliki intensitas gen TNF- $\alpha$  sebesar 33,03% pada lambung dan 32,19% pada usus. Sedangkan, pada perlakuan D dengan pemberian dosis maggot 100% memiliki tingkat intensitas yang lebih tinggi



dibandingkan perlakuan B dan C yaitu sebesar 33,79% pada lambung dan 32,53% pada usus.

TNF- $\alpha$  terbukti meningkatkan kelangsungan hidup makrofag dan juga membatasi pertumbuhan bakteri pada makrofag yang terinfeksi dengan cara meningkatkan generasi spesies oksidatif reaktif (ROS). Namun, ada beberapa kasus pada ikan yang terinfeksi bakteri yang memproduksi ROS berlebih menyebabkan teraktivasinya TNF- $\alpha$  merusak sel inang, menyebabkan necrosis dan meningkatkan mikobakteria dari makrofag yang terinfeksi (Zou dan Secombes, 2016).

Sistem imun berpengaruh terhadap tingkat intensitas kadar TNF- $\alpha$ . Ketika sistem imun tubuh menurun maka tubuh akan lebih rentan terpapar penyakit. Hal ini dikarenakan kemampuan imunitas tubuh yang lemah untuk melawan infeksi sehingga menyebabkan TNF- $\alpha$  diproduksi secara berlebih dan kadar TNF- $\alpha$  mengalami peningkatan. Faktor yang mempengaruhi kuat lemahnya sistem imun yaitu usia dan tingkat stress. Saat umur semakin tua semakin tinggi dapat menyebabkan kecepatan respon imun mulai menurun, sehingga lebih rentan terserang penyakit. Sedangkan, saat terjadinya stres hormon kortisol dan glukokortikoid akan memicu reaksi anti-inflamasi dari sistem imun yang menyebabkan kadar TNF- $\alpha$  mengalami peningkatan (Supit, *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil intensitas gen TNF- $\alpha$  diatas, dapat disimpulkan bahwa gen TNF- $\alpha$  tetap teraktivasi pada ikan yang sehat, namun tingkat intensitasnya lebih rendah dibandingkan ikan yang terinfeksi dan mengalami inflamasi. Saat ikan terpapar bakteri *A. salmonicida* ikan akan meningkatkan aktivitas gen TNF- $\alpha$  akan untuk menghancurkan atau membunuh bakteri yang masuk ke dalam tubuh.

Namun, jika dibandingkan dengan ikan perlakuan maggot yang terpapar bakteri yang sama dengan konsentrasi yang sama, tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  memiliki tingkat yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan yang hanya terpapar bakteri



tanpa pemberian pakan perlakuan. Hal ini membuktikan bahwa pemanfaatan maggot sebagai pakan imunostimulan pada ikan koi (*C. carpio*) berpengaruh terhadap tingkat intensitas TNF- $\alpha$  saat terpapar bakteri *A. salmonicida*. Dimana dari keempat perlakuan yang memiliki tingkat intensitas paling tinggi yaitu pada perlakuan A dengan dosis maggot 25% memiliki intensitas sebesar 31.48% pada lambung dan 34,68% pada usus yang berarti pada ikan tersebut memiliki tingkat respon imun yang sangat rendah dibandingkan perlakuan lainnya. Sedangkan pada perlakuan B dengan dosis maggot 50% memiliki tingkat intensitas yang paling rendah yaitu sebesar 32.16% pada lambung dan 32.13% pada usus. Sehingga dapat diartikan bahwa ikan koi (*C. carpio*) pada perlakuan B merupakan dosis terbaik yang memiliki respon imun yang lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya, dikarenakan sistem imunitas dalam tubuh untuk melawan bakteri dalam kondisi baik.

### 5.3.2. Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Hasil perbandingan Intensitas (%) gen sitokin IL-1 $\beta$  setiap perlakuan pada organ lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* pada organ lambung dan usus dengan 2 ulangan yang ditampilkan pada **Tabel 8**. Hasil Intensitas gen IL-1 $\beta$  menunjukkan bahwa Ikan sehat memiliki tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  lebih kecil dibandingkan ikan yang terinfeksi yang diberi atau tanpa perlakuan pakan maggot.

**Tabel 8.** Hasil Tingkat Intensitas Gen IL-1 $\beta$  pada ikan Koi (*C. carpio*)

No	Sampel	Intensitas IL-1 $\beta$		
		Ulangan 1	Ulangan 2	Rata-rata
1	K (-) Lambung	25,5974296	24,5847775	25,0911035
2	K (-) Usus	25,3049101	23,9660073	24,6354591
3	K (+) Lambung	27,4779674	33,1591272	30,3185473
4	K (+) Usus	26,5932621	28,0005397	27,2969009
5	A (25%) Lambung	33,8758554	33,1591272	33,5174913
6	A (25%) Usus	32,1942722	32,2485383	32,2214053
7	B (50%) Lambung	27,4110827	30,7215754	29,0663291
8	B (50%) Usus	26,0446747	30,1410646	28,0928697
9	C (75%) Lambung	32,9257711	28,1215021	30,5236366
10	C (75%) Usus	31,9489518	30,0053491	30,9771505
11	D (100%) Lambung	29,4830696	34,9737824	32,2284260



12	D (100%) Usus	32,2031464	32,2031463	32,2031463
----	---------------	------------	------------	------------

Hasil Tingkat intensitas gen sitokin IL-1 $\beta$  pada organ lambung ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* (**Tabel 8.**). Pada penelitian ini, menunjukkan bahwa ikan sehat memiliki tingkat intensitas IL-1 $\beta$  yang lebih kecil dibandingkan ikan kontrol positif dan ikan perlakuan. Pada ikan sehat memiliki intensitas gen IL-1 $\beta$  sebesar 25,6% dan 24,58% pada lambung. Pada ikan yang kontrol positif atau ikan yang terinfeksi tanpa pemberian pakan perlakuan imunostimulan memiliki intensitas sebesar 27,49% dan 33,16%. Pada ikan perlakuan A yaitu ikan yang terpapar bakteri *A. salmonicida* dengan pemberian pakan imunostimulan maggot 25% dari tepung ikan, memiliki intensitas gen TNF- $\alpha$  yang lebih tinggi dibandingkan ikan perlakuan lainnya yaitu sebesar 33,88% dan 33,16% pada lambung. Pada ikan perlakuan B dengan pakan dosis maggot 50% dari tepung ikan memiliki tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  terendah dibandingkan perlakuan lainnya. Adapun hasil intensitas gen IL-1 $\beta$  pada lambung sebesar 27,41% dan 30,72%. Pada ikan perlakuan C dengan dosis 75% memiliki intensitas gen IL-1 $\beta$  pada lambung dengan 2 ulangan sebesar 32,93%, 28,12%. Sedangkan, pada perlakuan terakhir yaitu perlakuan D dengan dosis maggot 100% dari tepung ikan memiliki tingkat intensitas pada lambung sebesar 29,48% dan 34,97%.

IL-1 $\beta$  merupakan sitokin yang bersifat pro-inflamasi yang sangat penting dalam sistem pertahanan tubuh inang saat terjadinya infeksi dan luka. Hal ini sesuai dengan pendapat Lopez-Castejon dan Brough, (2011) bahwa IL-1 $\beta$  diproduksi oleh berbagai jenis sel namun kebanyakan diproduksi dalam sel sistem kekebalan tubuh *innate*, seperti monosit dan makrofag, sehingga sangat penting dalam respons inang dalam menghadapi infeksi dan cedera. Sitokin ini diproduksi oleh makrofag teraktivasi sebagai proprotein, yang diproses secara proteolitik

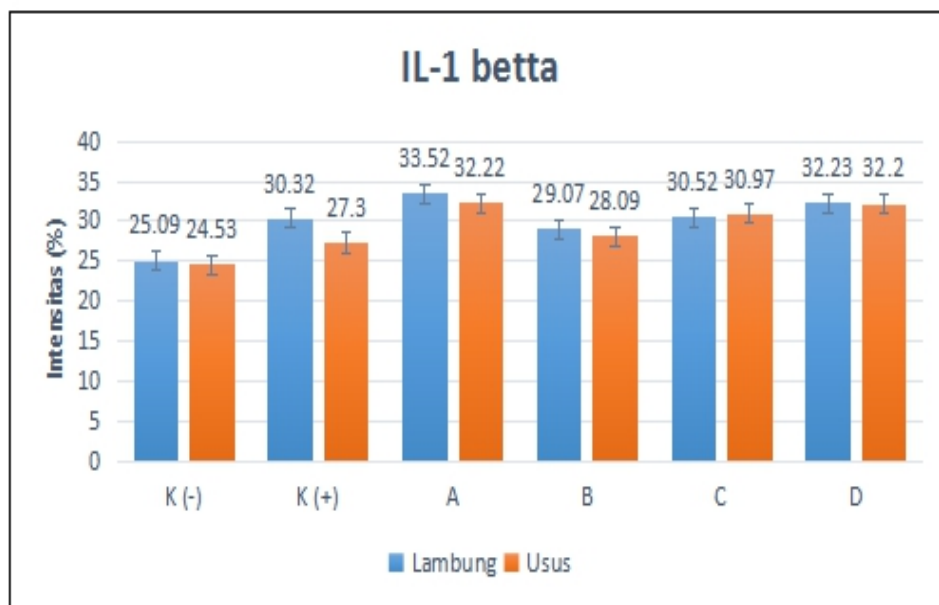


menjadi bentuk aktifnya oleh caspase 1 (CASP1/ICE). Sitokin ini merupakan mediator penting dari respon inflamasi, dan terlibat dalam berbagai aktivitas seluler, termasuk proliferasi sel, diferensiasi, dan apoptosis (Maroto, *et al.*, 2021).

Sedangkan, hasil tingkat intensitas gen sitokin IL-1 $\beta$  pada organ lambung ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* (**Tabel 8.**). Pada usus ikan sehat memiliki tingkat intensitas yang rendah dibandingkan perlakuan lain yaitu sebesar 25,3% dan 23,96%. Pada perlakuan ikan kontrol positif memiliki tingkat intensitas yang lebih tinggi dibandingkan ikan sehat yaitu sebesar 26,59% dan 28% pada organ usus. Sedangkan, pada perlakuan A memiliki tingkat intensitas pada usus yang paling tinggi dibandingkan perlakuan lainnya yaitu sebesar 32,19% dan 32,25%. Pada perlakuan B memiliki tingkat intensitas yang lebih rendah dibandingkan perlakuan A dan perlakuan lainnya pada usus yaitu sebesar 26,04% dan 30,14%. Pada ikan perlakuan C dengan dosis 75% memiliki intensitas gen IL-1 $\beta$  pada usus dengan 2 ulangan sebesar 31,95% dan 30,01%. Dan pada perlakuan terakhir perlakuan D memiliki tingkat intensitas sebesar 32,2% dan 28,92%.

Gen IL-1 $\beta$  akan terekspresi pada ikan sehat ataupun pada ikan sakit. Namun, memiliki tingkat intensitas yang berbeda. Biasanya gen ini akan mengalami peningkatan aktivitas saat terjadinya inflamasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Maroto, *et al.* (2021), bahwa IL-1 $\beta$  adalah anggota dari keluarga sitokin interleukin 1, sitokin ini berperan penting dan berkontribusi besar terhadap hipersensitivitas nyeri saat terjadinya inflamasi. Selain itu, IL-1 $\beta$  juga terekspresi pada berbagai tingkat di jaringan ikan yang sehat seperti ikan sehat, termasuk otot, usus, hati, kulit, sirip, jantung, otak, ginjal, insang, limfa dan organ pencernaan lainnya (Bo, *et al.*, 2015).





**Gambar 15.** Hasil Rata-rata Intensitas (%) gen sitokin IL-1 $\beta$  pada ikan koi (*C. carpio*)

Adapun hasil rata-rata tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  pada lambung dan usus ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* dari 2 ulangan dapat dilihat pada **Gambar 15**. Hasil rata-rata diatas menunjukkan bahwa tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  pada ikan kontrol atau ikan sehat memiliki intensitas yang paling rendah dibandingkan dengan ikan lainnya. Pada ikan sehat memiliki rata-rata intensitas sebesar 25,09% pada organ lambung dan 24,53% pada usus. Pada ikan yang terinfeksi tanpa pemberian pakan maggot mengalami peningkatan intensitas sebesar 30,32% pada lambung dan 27,3% pada usus ikan koi (*C. carpio*). Berbeda dengan ikan perlakuan A dengan pemberian pakan maggot dosis 25% mengalami peningkatan intensitas gen yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yaitu sebesar 33,52% pada lambung dan 32,22% pada usus ikan. Sedangkan, pada perlakuan B dengan dosis maggot sebesar 50% memiliki tingkat intensitas yang lebih rendah dibandingkan perlakuan lainnya, namun masih lebih tinggi dibandingkan dengan intensitas gen ikan sehat. Pada perlakuan B memiliki intensitas gen IL-1 $\beta$  pada organ lambung dan usus masing-masing sebesar 29,07% dan 28,09%. Intensitas gen

IL-1 $\beta$  pada perlakuan C dengan pemberian pakan maggot dosis 75% memiliki tingkat yang sedikit tinggi dibandingkan dengan perlakuan B. Intensitas pada lambung sebesar 30,52% dan 30,97% pada usus ikan. Sedangkan, pada perlakuan D memiliki tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  yang hampir sama di lambung dan usus yaitu sebesar 32,23% dan 32,2%.

IL-1 $\beta$  merupakan sitokin yang bersifat proinflamasi sehingga intensitas akan meningkat saat terjadinya inflamasi dibandingkan ikan sehat. IL-1 $\beta$  memiliki fungsi fisiologis yang sangat beragam dan perannya mengatur proses inflamasi pada organ ikan yang terinfeksi (Zou, *et al.*, 2016). Sitokin IL-1 $\beta$  telah terbukti sebagai salah satu mediator yang paling cepat dan penting dalam proses inflamasi pada ikan mas (Tanekhy, *et al.*, 2009). Peningkatan produksi IL-1 $\beta$  menyebabkan sejumlah sindrom autoinflamasi yang berbeda, terutama kondisi monogenik yang disebut sebagai Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes (CAPS), karena mutasi pada reseptor inflammasome NLRP3 yang memicu pemrosesan IL-1 $\beta$  (Maroto, *et al.*, 2021).

Berdasarkan hasil intensitas gen IL-1 $\beta$  diatas, terbukti bahwa gen IL-1 $\beta$  akan mengalami peningkatan saat terjadinya inflamasi dibandingkan ikan sehat. Ikan sehat akan memiliki kadar intensitas IL-1 $\beta$  yang lebih rendah dibandingkan dengan ikan yang terpapar bakteri *A. salmonicida*. Pada grafir hasil tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  diatas juga menunjukkan tingkat intensitas pada ikan perlakuan yang diberikan pakan yang memanfaatkan maggot sebagai imunostimulan memiliki tingkat intensitas yang lebih tinggi dibandingkan ikan sehat dan ikan sakit tanpa pemberian perlakuan. Hal ini, membuktikan bahwa pemanfaatan maggot sebagai imunostimulan pada ikan koi (*C. carpio*) dapat meningkatkan tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  dengan cara meningkatkan tingkat aktivitas gen IL-1 $\beta$  untuk merespon dan membunuh bakteri *A. salmonicida* yang masuk ke dalam tubuh ikan koi (*C. carpio*). Dari keempat perlakuan pakan



dengan dosis yang berbeda didapatkan tingkat intensitas gen IL-1 $\beta$  tertinggi pada perlakuan A baik pada organ lambung ataupun usus. Intensitas gen IL-1 $\beta$  pada perlakuan A sebesar 33,52% pada lambung dan 32,22% pada usus.

Sehingga dapat ditarik kesimpulan dari kedua hasil tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  tersebut bahwa pemanfaatan maggot sebagai pakan imunostimulan pada ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* dapat meningkatkan terhadap tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Dimana, pada tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan ikan yang terpapar bakteri tanpa pemberian pakan maggot.

Tingkat intensitas gen yang terendah dari keempat perlakuan yaitu perlakuan B dengan pemberian dosis maggot 50% dari tepung ikan. Hal ini dikarenakan semakin rendah kadar gen tersebut maka semakin baik sistem imun dan kemampuan imunitas tubuh yang baik dibandingkan perlakuan lainnya.

Diduga kandungan protein pada formulasi pakan perlakuan B merupakan formulasi pakan terbaik yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan imunostimulan ikan koi (*C. carpio*). Kandungan protein tersebut dimanfaatkan ikan sebagai imunisasi dalam tubuh dalam bentuk antibody. Antibodi tersebut berupa sel limfosit B dan sel limfosit T. Sesuai dengan pernyataan Sumarmi, (2020), bahwa antibodi adalah faksin protein yang berada di dalam peredaran darah dan cairan mukosa yang berfungsi untuk menetralsir dan mengikat bakteri dari luar. Sementara protein yang dihasilkan sel limfosit T berupa sitokin, *tumor necrosis alfa* (TNF- $\alpha$ ), interferon yang berperan dalam melawan bakteri atau virus yang masuk ke dalam sel/tubuh.

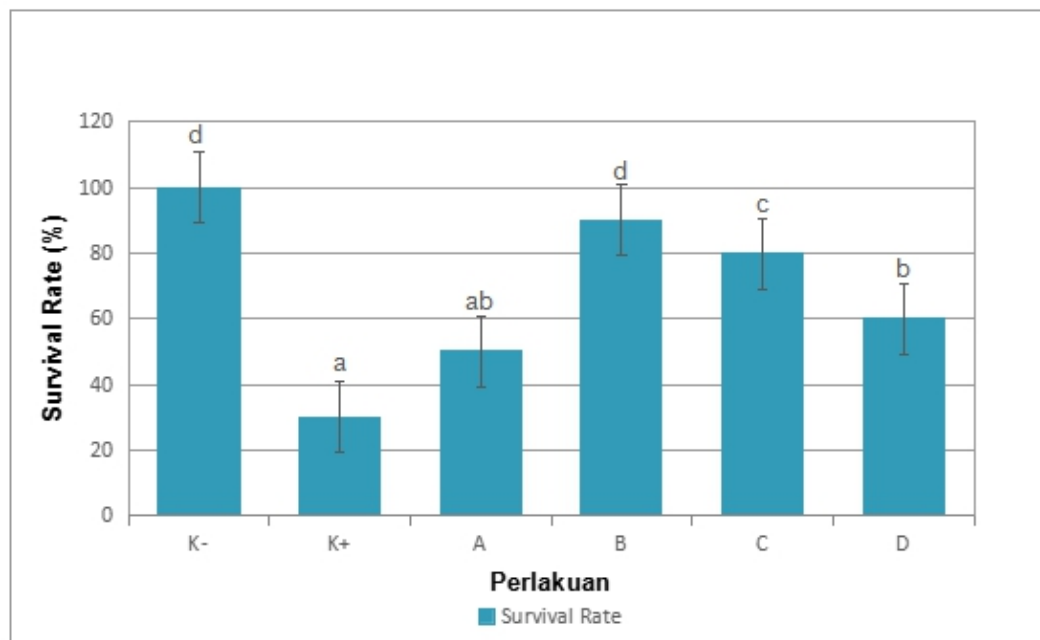
#### 5.4. Survival Rate (SR)

Kelulusan (SR) pada semua penelitian di semua perlakuan dengan 3 ulangan didapatkan hasil sebagai berikut (**Tabel 7.**).

**Tabel 9.** *Survival Rate* Ikan Koi (*C. carpio*) Selama Penelitian

Perlakuan	Jumlah Ikan Awal (N <sub>0</sub> )	Jumlah Ikan Akhir (N <sub>t</sub> )	SR (%)
K-	10 ekor	10 ekor	100%±0.00 <sup>d</sup>
K+	10 ekor	3 ekor	30%±5.77 <sup>a</sup>
A	10 ekor	8 ekor	50%±5.77 <sup>ab</sup>
B	10 ekor	9 ekor	90%±5.77 <sup>d</sup>
C	10 ekor	6 ekor	80%±5.77 <sup>c</sup>
D	10 ekor	5 ekor	60%±5.77 <sup>b</sup>

Hasil Kelulushidupan (SR) tertinggi selama penelitian (**Gambar 16.**) yaitu perlakuan B (50%) dan perlakuan C(75%) dengan memiliki nilai persentase kelulus hidupan sebesar 90% dan 80%. Dimana persentase tersebut paling mendekati persentase kontrol negatif dengan nilai 100%. Perlakuan B dan C memiliki nilai yang berbeda nyata yang ditandai dengan notasi d dan c (data SPSS pada **Lampiran 9.**). Sedangkan, persentase kelulushidupan paling rendah yaitu pada perlakuan A(25%) yaitu sebesar 50% yang menandakan kematian 50% dari jumlah populasi ikan yang dipelihara, yang ditandai dengan notasi ab yang menandakan pada perlakuan ini memiliki nilai kelulushidupan yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan K+ dan C.

**Gambar 16.** *Survival Rate* Ikan Koi (*C. carpio*)



Hal ini diduga penggunaan maggot sebagai bahan imunostimulan dalam pakan dengan dosis tertentu dapat meningkatkan sistem imun pada ikan mas sehingga persentase kelulushidupannya tinggi saat terpapar bakteri *A. salmonicida*. Bakteri tersebut dihambat pertumbuhannya dengan salah satu senyawa yang terkandung dalam maggot yaitu flavonoid. Hal ini sesuai dengan pendapat Nugraha, *et al.*, (2017) bahwa flavonoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding dan membran selnya serta menonaktifkan kerja enzim. Menurut Radji (2011), menyatakan bahwa dinding sel bakteri negatif terdiri atas satu atau lebih dari 20 lapisan peptidoglikan yang tipis. Dinding sel bakteri gram negatif lebih rentan terhadap guncangan fisik, seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri yang lainnya. Hal ini terjadi karena dinding sel bakteri gram negatif hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan dan tidak mengandung asam terikat.

## **5.5. Kualitas Air**

### **5.5.1. Suhu**

Suhu sangat berperan penting terhadap pertumbuhan dan kesehatan ikan. Laju pertumbuhan ikan akan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu, akan tetapi peningkatan suhu secara drastis dapat menimbulkan penyakit bahkan menyebabkan kematian pada ikan karena terjadinya perubahan daya angkut darah secara cepat. Suhu terlalu rendah juga mempengaruhi ikan, dimana pada suhu rendah nafsu makan ikan akan berkurang sehingga nantinya pertumbuhan ikut melambat, sistem imun menurun dan akan lebih mudah terserang penyakit.

Namun, sebaliknya jika suhu perairan terlalu tinggi akan menyebabkan ikan stress bahkan hingga mati dikarenakan kekurangan oksigen.

Berdasarkan hasil pengukuran selama pemeliharaan, kualitas air dengan parameter suhu berkisar antara 24-26,8°C. Nilai tersebut masih dikategorikan



kisaran normal. Karena menurut Fachmijany, *et al.*, (2014), kisaran suhu normal selama pengamatan berkisar antara 23-30°C.

#### 5.5.2. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman atau biasa disebut dengan pH yang menunjukkan aktivitas ion hydrogen dalam larutan tersebut dan dinyatakan sebagai konsentrasi ion hidrogen (mol/liter). pH dibagi menjadi 3 kelompok konsentrasi yaitu asam, netral dan basa. Air murni mempunyai pH netral 7 karena berasosiasi sempurna dan memiliki ion  $H^+$  dan ion  $OH^-$  dalam konsentrasi yang sama. Semakin tinggi konsentrasi ion  $OH^-$  maka nilai pH akan semakin tinggi  $>7$  dan bersifat basa. Sedangkan, jika konsentrasi ion  $OH^-$  semakin rendah maka semakin rendah pula nilai pH  $<7$ , dan perairan tersebut bersifat asam.

Berdasarkan hasil pengukuran selama pemeliharaan, kualitas air dengan parameter derajat keasaman (pH) berkisar antara 5,82-7,85. Nilai tersebut masih dikategorikan kisaran normal. Hal ini dikarenakan menurut Fachmijany, *et al.*, (2014), kandungan pH masih berada pada kisaran yang normal untuk budidaya ikan mas jika nilai pH nya antara 6,81-7,87.

#### 5.5.3. Oksigen Terlarut (DO)

Oksigen terlarut adalah satu jenis gas terlarut dalam air dengan jumlah yang sangat banyak. Ikan sangat membutuhkan oksigen untuk kelangsungan hidupnya guna membakar makanan untuk menghasilkan aktivitas, seperti berenang, pertumbuhan, reproduksi, represi dan sebagainya. Kelarutan oksigen dalam air sangat berkaitan dengan suhu di perairan tersebut.

Berdasarkan hasil pengukuran selama pemeliharaan, kualitas air dengan parameter oksigen terlarut (DO) berkisar antara 5,02-7,52 mg/l. Nilai tersebut masih dikategorikan kisaran normal. Karena menurut Fachmijany, *et al.*, (2014),



kandungan DO masih berada pada standar optimal jika nilai DO nya yaitu 4,5-8,1 mg/l.



## 6. PENUTUP

### 6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil pada penelitian ini adalah:

1. Hasil tingkat intensitas gen sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dapat disimpulkan bahwa Pemanfaatan maggot sebagai pakan pada ikan koi (*C. carpio*) yang terpapar bakteri *A. salmonicida* dapat meningkatkan tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Dimana, pada tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan ikan yang terpapar bakteri tanpa pemberian pakan maggot.
2. Dosis pemberian maggot terbaik adalah perlakuan B dengan dosis 50% dari tepung ikan. Pada perlakuan ini memiliki tingkat intensitas gen TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang paling rendah yang dapat didefinisikan bahwa ikan pada perlakuan ini memiliki tingkat respon imun dan kemampuan imunitas tubuh yang baik dibandingkan perlakuan lainnya.

### 6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian untuk mendapatkan hasil yang lebih baik diperlukan adanya pengujian lebih lanjut mengenai pengukuran ekspresi gen sitokin TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dengan menggunakan metode sequencing, serta penelitian tentang peningkatan sistem imun ikan tersebut dipengaruhi protein yang terkandung dalam ikan atau senyawa aktif flavonoid yang ada didalam maggot.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Syafar, D. 2017. Blood description, parasite infestation and survival rate of carp (*Cyprinus carpio*) which is exposed by spore protein myxobolus koi on rearing pond as immunostimulan material. Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga, Indonesia JBP, 19(2).
- Adikesavalu, H., P. Paul, L. Priyadarsani, S. Banerjee, S. N. Joardar and T. J. Abraham. 2016. *Edwardsiella tarda* induces dynamic changes in immune effector activities and endocrine network of *Pangasius pangasius* (Hamilton, 1822). *Aquaculture*. 462 : 24–29.
- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1992. Pengendali Hama dan Penyakit Ikan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 33 hal.
- Afrianto, E., E. Liviawaty, Z. Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit ikan. Jakarta, Penebar Swadaya. 62-63 hlm.
- Amandanisa, A. dan P. Suryadarma. 2020. Kajian Nutrisi dan Budi Daya Maggot (*Hermentia illuciens* L.) Sebagai Alternatif Pakan Ikan di RT 02 Desa Purwasari, Kecamatan Dramaga, Kabupaten Bogor. *Jurnal Pusat Inovasi Masyarakat*. 2(5): 798-804.
- Amanu, S., Kurniasih dan S. Indaryullanto. 2014. Identifikasi penyakit pada budidaya ikan air tawar di Bali. *Jurnal Veteriner*. 15(4): 474-486.
- Arindita, C., Sarjito., dan S. B. Prayitno. 2014. Pengaruh penambahan serbuk lidah buaya (aloe vera) dalam pakan terhadap kelulushidupan dan profil darah ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(3): 66-75.
- Arnadotitir, H., I. Hvanndal, V. Andresdottir, S. E. Burr, J. Frey, B. Gudmundsdottir. 2009. The Asap1 peptidase of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes* is a highly conserved deuterolysin metalloprotease (Family M35) and a major virulence factor. *Journal Of Bacteriology*. 19(1): 403-410.
- Buss, H., Dörrie, A., Schmitz, M.L., Hoffmann, E., Resch, K., Kracht, M., 2004. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK) $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J. Biol. Chem*. 279 : 55633–55643.
- Castro, R., & Tafalla, C. 2015. Overview of fish immunity. *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00002-9>
- Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y., Ali, M. M., Mcguire, F., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. 2013. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*. 27(6). 669–684.



Chen, Y. M., Wang, T. Y., & Chen, T. Y. (2014). Immunity to betanodavirus infections of marine fish. *Developmental and Comparative Immunology*. **43**(2): 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.019>

Choi, W. Hyung., MeiHua Jiang. 2014. Evaluation of antibacteria activity of hexanediodic acid isolated from *Hermetia illuncens* larvae. *Journal applied biomedicine*. 11 hlm.

Dotta, G., J. I. A. D. Andrade, E. L. T. Goncalves, A. Brum, J. J. Mattos, M. Maraschin and Martins. 2014. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and Aloe barbadensis. *Journal Fish & Shellfish Immunology*. **39**: 280-284.

Eriani, K., Ainsyah, Rosnizar dan Ichsan. 2018. Uji efek imunostimulan ekstrak metanol daun flamboyan [*Delonix regia* (Boj. ex.hoox) Raf] terhadap peningkatan sel-sel imun pada mencit strain *Swiss-Webster*. *Jurnal Natural*. **20**(10): 39-44.

Fachmijany, S., C. Tjandra, dan M. Endang. 2014. Laju pertumbuhan ikan mas (*Cyprinus carpio* L) dengan pemberian pakan lemna (*Lemna Perpusilla* Torr.) segar pada kolam sistem aliran tertutup. *Limnotek*. **21** (2): 177-184.

Fahmi MR, S. Hem dan IW. Subamia. 2009. Potensi maggot untuk peningkatan pertumbuhan dan status kesehatan ikan. *Jurnal Riset Akuakultur*. **4**(2):221- 232.

Fahmi, M. 2015. Optimalisasi proses biokonversi dengan menggunakan peningkatan pertumbuhan dan status kesehatan ikan. *Jurnal Riset Akuakultur*. **4**(2): 221-232.

Fitri, w. E., dan A. Putra. 2021. Review: Peranan senyawa flavonoid dalam meningkatkan sistem imun di masa pandemi covid-19. *Prosiding Seminar Nasional Stikes Syedza Saintika*. **1** (1):61-72.

Gomez, D., Sunyer, J. O., & Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*. **35**(6): 1729–1739. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.032>

Haryani, A., R. Grandiosa, I. D Buwono dan A. Santika. 2012. Uji efektivitas daun pepaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3**(3): 213-220.

Hossain, M.D., M.K. Hossain, M.H. Rahman, A. Akter, and D.A. Khanom. 2008. Prevalence of ectoparasites of carp fingerlings at Santaher, Bogra. *Universal Journal of Zoog*. **27**: 17-19

Irawati, L., Acang, N. & Irawati, N. 2008. Ekspresi Tumor Necrosis Factor-Alpha ( Tnf- A ) Dan Interleukin-10 ( Il-10 ) Pada Infeksi. *Majalah Kedokteran Andalas*, **1**(32): 16–28.



Jasmadinar, Y. 2009. Penggunaan Ekstrak *Gracilaria Verrucosa* untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang Vaname *Litopenaeus vannamei*. Tesis. Institut Pertanian Bogor.

Kartika, A.I. 2018. Optimasi Annealing temperature primer mRNA RECK dengan metode one step qRT-PCR. *Jurnal Labora Medika*. **2**(1): 22–33.

Kordi, M. G. H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT. Rineka Cipta dan PT. Bina Adiaksara. Jakarta. 194 hlm.

Kusrini, E., Cindelar, S., & Prasetio, A. B. 2015. Pengembangan budidaya ikan hias koi (*Cyprinus carpio*) lokal di balai penelitian dan pengembangan budidaya ikan hias depok. *Media Akuakultur*. **10**(2): 71. <https://doi.org/10.15578/ma.10.2.2015.71-78>

Makkar HPS, G. Tran, V. Heuze, and P. Ankreas. 2014. State of the art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science Technology*. **197**:1-33.

Mangunwardoyo W, Aulia, and S. Hem. 2011. Penggunaan bungkil inti kelapa sawit hasil biokonversi sebagai substrat pertumbuhan larva *Hermetia illucens* L (maggot). *Biota*. **16**(2):166-172.

Mannaa, F.A. & Abdel-Wahhab, K.G. 2016. Physiological potential of cytokines and liver damages. *Hepatoma Research*. **2**(6): 131.

Maroto, N. G. D., G. G. Vicien, G. Polcaro, M. Banuls, N. Albert, A. Villanueva and D. G. Mollevi. 2021. The blockade of tumoral IL-1 $\beta$  mediated signaling in normal colonic fibroblasts sensitizes tumor cells to chemotherapy and prevents Inflammatory CAF activation. *International Journal of Molecular Sciences*. **22** (9): 4960.

Mokolensang, J. F., M. G. V. Hariawan., L. Manu. 2018. Maggot (*Hermetia illucens*) Sebagai Pakan Alternatif Budidaya Ikan. *E-Jurnal Budidaya Perairan*. **6**(3): 32-37.

Muqsih, A. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak fenol *Gracillaria verrucosa* secara In vitro. *Samakia*. **3**(1): 69-75.

Murni dan Early Septiningsih. 2015. Optimasi pemberian kombinasi maggot dengan pakan buatan (pelet) terhadap pertumbuhan dan sintasan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur. 98 hlm.

Natalist, 2003. pengaruh pemberian tepung wortel (*Daucus carota* L.) dalam pakan buatan terhadap warna ikan mas koi (*Cyprinus carpio* L.). *Skripsi*. Fakultas Teknologi. Universitas Artma Jaya. Yogyakarta. 43 hlm.

Nguyen, T.T.T., Nguyen, H.T., Wang, P.C. & Chen, S.C. 2017. Identification and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-8, in cobia (*Rachycentron canadum* L.) in response to *Streptococcus dysgalactiae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*. **67**: 159–171. Tersedia di <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.014>.

Noerbaeti, E. 2019. Uji toksisitas ekstrak daun bakau, *Sonneratia alba*,



Novitasari, D. A., R. Elvyra dan D. I. Roslim. 2014. Teknik isolasi dan elektroforesis dna total pada Kryptopterus apogon (Bleeker 1851) dari Sungai Kampar kiri dan tapung hilir Kabupaten Kampar Provinsi Riau. *JOM FMIPA.* 1(2) : 258-261.

Nugraha, Agung dan Sri. 2017. Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas senyawa flavonoid sebagai antibakteri dari daun mangga. *Indonesia Journal of Chemical Science. J. Chem.Sci.* 6 (2): 91-96.

Ode, I. 2013. Kajian sistem imunitas untuk pengendalian penyakit pada ikan dan udang. *Agrikan: Jurnal Ilmiah Agribisnis dan Perikanan.* 6(2): 41.

Prado, M., A. Boix and C. v. Holst. 2013. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel and horse mackerel. *Food Control.* 34 : 19-23.

Priyatna, R., S. Indarjulianto dan Kurniasih. 2011. Infeksi *Aeromonas salmonicida* dari berbagai wilayah di Indonesia pada ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Biota.* 16 (2): 287-297.

Radji, M.2011. mikrobiologo Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran. Jakarta:EGC.

Reis, M. I. R., Vale, A., Pereira, P. J. B., Azevedo, J. E., & Santos, N. M. S. (2012). Caspase-1 and IL-1 b Processing in a Teleost Fish, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050450>

Ristiati. 2015. uji bioaktif forbazol E terhadap hambatan pertumbuhan pada *Staphylococcus aerus*. *Jurnal Sains dan Teknologi.* 4(1): 39-47.

Rohyani, I.S., E. Aryanti dan Suropto. 2015. Kandungan fitokimia beberapa jenis tumbuhan lokal yang sering dimanfaatkan sebagai bahan baku obat di pulau Lombok. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.* 1 (2): 388-391.

Rosalina. 2007. Efikasi pemberian Zinc pada diare. Kongres Nasional III Badan Koordinasi gastroenterologi Anak Indonesia. Surabaya: 159-167.

Rousdy, D.W. & Wijayanti, N. 2016. Peningkatan imunitas nonspesifik ikan mas , *Cyprinus carpio* ( Linnaeus , 1758 ) yang diinfeksi *Aeromonas hydrophilla* dengan pemberian asam humat tanah gambut [ Enhancement of nonspecific immunity in *Aeromonas hydrophilla* infected carp , *Cyprinus carpio* . 16(3): 345–352.

Sambrook, J., and Russell, R.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, N.Y.

Saputra, E., F. H. Taqwa dan M. Fitriani. 2013. Kelangsungan hidup dan pertumbuhan benih nila (*Oreochromis niloticus*) selama pemeliharaan dengan padat tebar berbeda di lahan pasang surut Telang 2 Banyuasin. *Jurnal Berkala Ilmiah Efisiensi.* 12(2): 7-81.

Sari, wardiyanto, A. Setyawan. 2014. Profil Histopatologi Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang distimulasi Jintan hitam (*Nigella sativa*) dan diinfeksi viral nervous necrosis (VNN). *Aquasains (Jurnal Ilmu Perikanan dan Sumberdaya Peraira).* 207-212.



Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. **35**(12): 1336–1345. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.001>

Segner, H., A. M. Möller, M. Wenger and A. C. Nakayama. 2012. Fish Immunotoxicology: Research at the Crossroads of Immunology, Ecology and Toxicology. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Environmental Pollution and Ecotoxicology*. 1-12.

Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar, 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some specific and non-specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*. **19**. p : 293 - 306

Setiadi, P., Saerang, D.P.E. & Runtu, T. 2014. Perhitungan Harga Pokok Produksi Penentuan Harga Jual Pada CV. Minahasa Mantap Perkasa. *Jurnal Berkala Ilmiah Efisiensi*. **14**(2): 181–188.

Setiawan, F., Yanuhar, U. & Kurniawan, A. 2019. Status hematologi dan respon imun ikan koi (*Cyprinus carpio*) yang terinfeksi *Myxobolus* sp. dengan treatment dimilin (hematological status and immune response of koi fish (*Cyprinus carpio*) Infected by *Myxobolus* sp. With Treatment of Dimilin). *SAINTEK PERIKANAN : Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*. **15**(1): 80–85.

Sheppard, D.C., J.K. Torberlin, J.A. Joyce, B.C. Kiser, and S.M. Somner. 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*). *Journal of Medical Entomology*. **39**(4): 695-698.

Skoog, Douglas, A., F. J. Holler and T. A. Nieman. 1998. Principles of Instrumental Analysis 5<sup>th</sup> ed. Books. Australia. 162 page.

Somerville, C., Cohen, M., Pantanella, E., Stankus, A., & Lovatelli, A. 2014. Small-scale aquaponic food production. Integrated fish and plant farming. FAO Fisheries and Aquaculture.

Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*. **4**(1): 89–101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>

Suhermanto, A., S. Andayani dan Maftuch. 2013. Pengaruh total fenolteripang pasir (*Holothuria scabra*) terhadap respon imun non spesifik ikan mas (*Cyprinus carpio*). **13**(2): 225-233.

Sumino, A. Supriyadi dan Wardiyanto. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Patin (*Pangasionodon hypophthalmus*). *Jurnal Sain Veteriner*. **31**(1): 79-88.

Supit, I. A., D. H. C. Pangemanan dan S. R. Maruduh. 2015. Profil tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) berdasarkan indeks massa tubuh (IMT) pada mahasiswa fakultas kedokteran UNSRAT angkatan 2014. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. **3**(2): 640-643.



Takahashi, J. D. B. and E.C. Urbinati. 2014. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências. Fish Immunology*. **86**(3): 1483-1495.

Tomberlin, J.K., D.C. Sheppard, and J.A. Joyce. 2002. Selected Life-History Traits of Black Soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) Reared on Three Artificial Diets. *Annals of The Entomology Society of America*. **95**(3):379-386.

Tomberlin, J.K., P.H. Adler, and H.M. Myers. 2009. Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environment Entomology*. **38**(3):930-934.

Uvell, H. and Y. Engstrom. 2007. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends in Genetics*. **23**(7): 342-349.

Vaerman, J.L., Saussoy, P. & Ingargiola, I. 2004. Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. **18**(2): 212-214.

VanGuilder, H.D., Vrana, K.E. & Freeman, W.M. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. **44**(5): 619-626. <https://doi.org/10.2144/000112776>

Wang, T and C. J. Secombes. 2013. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. **35** : 1703-1718.

Wang, T. & Secombes, C.J. 2013. The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish and Shellfish Immunology*. **35**(6): 1703-1718. Tersedia di <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.030>.

Wang, Y., Y. Gao, H. Ding, S. Liu, X. Han, J. Gui and D. Liu. 2016. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from Moringa oleifera leaf and evaluation of antioxidant activity. *Journal Food Chemistry*. **218**: 152-158.

Wangko, S. 2014. *Hermetia illucens* aspek forensik, kesehatan, dan ekonomi. *Jurnal Biomedik (JBM)*. **6**(1): 23-29.

Warmadewi, D. A. 2017 *Buku Ajar Mutasi*. Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Denpasar. 53 hlm.

Wibawan, I. W. T. dan R. D. Soejoedono. 2013. *Intisari Immunologi medis*. Fakultas Kedokteran Hewan, IPB. Bogor. 2-3 dan 26 hlm.

Zhang, J.-M. & An, J. 2009. NOT RIGHT REFERENCE Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. **69**(2): 482-489.

Zhang, N and K. S. Nandakumar. 2018. Recent advances in the development of vaccines for chronic inflammatory autoimmune diseases. *Vaccine*. **36**: 3208-3220

Zhu, L. L. Nie, G. Zhu, L. Xiang, J. Shao. 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology*. **39**: 39-62. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.04.001>



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Jadwal Penelitian

No	Nama Kegiatan	Jan	Feb	Maret	April	Mei	Juli
1	Bimbingan Proposal						
2	Uji Kelayakan						
3	Seminar Proposal						
4	Penelitian						
5	Pengolahan Data						
6	Submit Jurnal						
7	Seminar Hasil						
8	Ujian Tesis						



## Lampiran 2. Sertifikat Bakteri *A. salmonicida*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN  
BADAN KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU, DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN  
**BALAI UJI STANDAR KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU,  
DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN**

JALAN RAYA SETU NO. 1, SETU CIPAYUNG, JAKARTA TIMUR 13880

TELP. : (021) 8451378, 84599367, 8448506 FAKSIMILE ( 021) 8448523, 8448679

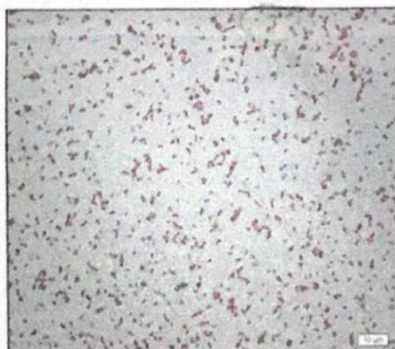
LAMAN www.buskipm.bkipm.id POS ELEKTRONIK buskipm@kcp.go.id, buski\_jkt@yahoo.com, buskipm@gmail.com

### SERTIFIKAT ANALISIS

**Strain Bakteri : *Aeromonas salmonicida***

Pasase 3 dari biakan original stock  $\leq 4$

Kode sampel	: 258C/BUSKIPM/2019
Asal Isolat	: NCIMB 13077
Kondisi Tumbuh	: Media Tumbuh TSA 0%; Temperatur : 27°C
Pengawetan	: Kering Beku
Kemurnian	: Berdasarkan hasil inokulasi pada media selektif dan non selektif menunjukkan morfologi sesuai dengan <b><i>Aeromonas salmonicida</i></b>
Pengujian	: Dilakukan dengan pewarnaan gram, uji biokimia
Cara Pemeliharaan	: Biakan dari kering beku dibuat stock dalam medium cair kemudian di simpan dalam freezer/suhu beku
Karakteristik Bakteri	: Berdasarkan <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> (Holt, et al.1996)
Masa Berlaku Bahan	: 6 (enam) Tahun sejak pembuatan
Gambar Pengecatan	:
Gram	





## Lampiran 2. (Lanjutan)

Karakterisasi Bakteri	
1. Gram	-
2. Bentuk	Batang
3. Indole production	-
4. MR	+
5. VP	-
6. Citrate, Simmons	-
7. H <sub>2</sub> S production	-
8. Urea hydrolisis	-
9. Phenylalanine deaminase	-
10. Lysine decarboxilase	-
11. Arginin dihydrolase	+
12. Ornithin decarboxilase	-
13. Motility	-
14. Gelatin hydrolysis	-
15. Glucose	+
16. Gas from glucose	+
17. Arabinose	-
18. Glycerol	-
19. Inositol	-
20. Lactose	-
21. Maltose	+
22. Mannitol	+
23. Salicin	-
24. Sorbitol	-
25. Sucrose	-
26. Trehalose	-
27. Xylose	-
28. Esculin hydrolysis	+
29. DNase	+
30. Nitrate reduction	+
31. Oxidase	+
32. Brown soluble pigment	+

Ka. Sie. Pengujian HPIK  
Mutu dan Keamanan  
Hasil Perikanan,

Slamet Andriyanto, S.Si  
NIP. 19821012 200604 1 001



Lampiran 3. Hasil Analisis Proksimat

BAHAN DASAR	%	komposisi (%)	KOMPOSISI KIMIA BAHAN								
			DIET	T. Ikan	Kedelai	T.Maggot	T.Gaplek	Dedak	T. Tapioka	minyak ikan	Vit & Mineral Mix
T. Ikan	30,00	K-KERING	88,14	92,92	91,97	87,91	87,73	91,36	91,59	0,00	100
Kedelai	27,00	PROTEIN	30,48	55,06	39,60	53,79	2,66	19,43	0,14	0,00	
T. Maggot	0,00	LEMAK	14,34	8,57	25,54	14,49	0,67	5,19	0,04	100,00	
T. Gaplek	13,00	SERAT	6,05	6,97	4,43	10,40	4,83	11,69	4,83	0,00	
Dedak (Katul)	15,00	ABU	9,95	21,27	5,82	10,32	4,17	7,48	4,17	0,00	
T. Tapioka	8,00	BETN	36,18	8,13	24,61	11,00	87,67	56,21	90,82	0,00	
minyak ikan	4,00	ENERGI	4,26	3,85	5,26	4,43	3,70	3,69	3,64	9,00	0,00
Vit & Mineral MIX	3,00	Harga (Rp/kg)	8545,00	15000	8000	11000	2500	4000	7000		10000
TOTAL	100,0										



#### Lampiran 4. Formulasi Pakan yang Digunakan

- Formulasi Pakan dengan Dosis 25%

BAHAN DASAR	%	komposisi (%)	KOMPOSISI KIMIA BAHAN								
			DIET	T. Ikan	T. Kedelai	T. Maggot	T. Gaplek	T. Dedak	T. Tapioka	Minyak Ikan	Vit & Mineral Mix
T. Ikan	22,50	K-KERING	88,59	92,92	91,97	87,91	87,73	91,36	91,59	0,00	100
Kedelai	27,00	PROTEIN	30,48	55,06	39,60	53,79	2,66	19,43	0,14	0,00	
T. Maggot	7,68	LEMAK	13,91	8,57	25,54	14,49	0,67	5,19	0,04	100,00	
T. Gaplek	13,00	SERAT	6,37	6,97	4,43	10,40	4,83	11,69	4,83	0,00	
Dedak (Katul)	15,00	ABU	9,18	21,27	5,82	10,32	4,17	7,48	4,17	0,00	
T. Tapioka	8,72	BETN	37,07	8,13	24,61	11,00	87,67	56,21	90,82	0,00	
minyak ikan	3,10	ENERGI	4,26	3,85	5,26	4,43	3,70	3,69	3,64	9,00	0,00
Vit & Mineral MIX	3,00	Harga (Rp/kg)	8225,08	15000	8000	11000	2500	4000	7000		10000
TOTAL	100,0										

- Formulasi Pakan dengan Dosis 50%

BAHAN DASAR	%	komposisi (%)	KOMPOSISI KIMIA BAHAN								
			DIET	T. Ikan	Kedelai	T. Maggot	T. Gaplek	Dedak	T. Tapioka	minyak ikan	Vit & Mineral Mix
T. Ikan	15,00	K-KERING	88,94	92,92	91,97	87,91	87,73	91,36	91,59	0,00	100
Kedelai	27,00	PROTEIN	30,48	55,06	39,60	53,79	2,66	19,43	0,14	0,00	
T. Maggot	15,35	LEMAK	13,58	8,57	25,54	14,49	0,67	5,19	0,04	100,00	
T. Gaplek	13,00	SERAT	6,67	6,97	4,43	10,40	4,83	11,69	4,83	0,00	
Dedak (Katul)	15,00	ABU	8,40	21,27	5,82	10,32	4,17	7,48	4,17	0,00	
T. Tapioka	9,35	BETN	37,87	8,13	24,61	11,00	87,67	56,21	90,82	0,00	
minyak ikan	2,30	ENERGI	4,26	3,85	5,26	4,43	3,70	3,69	3,64	9,00	0,00
Vit & Mineral MIX	3,00	Harga (Rp/kg)	7908,17	15000	8000	11000	2500	4000	7000		10000
TOTAL	100,0										

### Lampiran 5. (Lanjutan)

- Formulasi Pakan dengan Dosis 75%

BAHAN DASAR	%	komposisi (%)	KOMPOSISI KIMIA BAHAN								VIT & Mineral Mix
			DIET	T. Ikan	Kedelai	T.Maggot	T.Gaplek	Dedak	T. Tapioka	minyak ikan	
T. Ikan	7,50	K-KERING	89,29	92,92	91,97	87,91	87,73	91,36	91,59	0,00	100
Kedelai	27,00	PROTEIN	30,48	55,06	39,60	53,79	2,66	19,43	0,14	0,00	
T. Maggot	23,03	LEMAK	13,25	8,57	25,54	14,49	0,67	5,19	0,04	100,00	
T. Gaplek	13,00	SERAT	6,98	6,97	4,43	10,40	4,83	11,69	4,83	0,00	
Dedak (Katul)	15,00	ABU	7,62	21,27	5,82	10,32	4,17	7,48	4,17	0,00	
T. Tapioka	9,97	BETN	38,67	8,13	24,61	11,00	87,67	56,21	90,82	0,00	
minyak ikan	1,50	ENERGI	4,26	3,85	5,26	4,43	3,70	3,69	3,64	9,00	0,00
Vit & Mineral MIX	3,00	Harga (Rp/kg)	7591,25	15000	8000	11000	2500	4000	7000		10000
TOTAL	100,0										

- Formulasi Pakan dengan Dosis 100%

BAHAN DASAR	%	komposisi (%)	KOMPOSISI KIMIA BAHAN								VIT & Mineral Mix
			DIET	T. Ikan	Kedelai	T.Maggot	T.Gaplek	Dedak	T. Tapioka	minyak ikan	
T. Ikan	0,00	K-KERING	89,73	92,92	91,97	87,91	87,73	91,36	91,59	0,00	100
Kedelai	27,00	PROTEIN	30,49	55,06	39,60	53,79	2,66	19,43	0,14	0,00	
T. Maggot	30,71	LEMAK	12,82	8,57	25,54	14,49	0,67	5,19	0,04	100,00	
T. Gaplek	13,00	SERAT	7,29	6,97	4,43	10,40	4,83	11,69	4,83	0,00	
Dedak (Katul)	15,00	ABU	6,85	21,27	5,82	10,32	4,17	7,48	4,17	0,00	
T. Tapioka	10,69	BETN	39,56	8,13	24,61	11,00	87,67	56,21	90,82	0,00	
minyak ikan	0,60	ENERGI	4,26	3,85	5,26	4,43	3,70	3,69	3,64	9,00	0,00
Vit & Mineral MIX	3,00	Harga (Rp/kg)	7271,33	15000	8000	11000	2500	4000	7000		10000
TOTAL	100,0										



Lampiran 5. Hasil Uji Kemurnian dan Konsentrasi RNA

No.	Sample ID	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	Myxobolus K(+)	13/03/2021 10:46	13153.5	ng/ $\mu$ l	328.837	182.946	1.80	1.15	RNA	40.00
2	Myxobolus K(-)1	13/03/2021 10:49	4534.3	ng/ $\mu$ l	113.356	67.882	1.67	1.45	RNA	40.00
3	Myxobolus K(-)2	13/03/2021 10:50	3616.8	ng/ $\mu$ l	90.419	50.035	1.81	1.53	RNA	40.00
4	Aeromonas K(-) L1	13/03/2021 11:07	14690.2	ng/ $\mu$ l	367.256	240.195	1.53	1.11	RNA	40.00
5	Aeromonas K(-) L2	13/03/2021 11:08	1817.7	ng/ $\mu$ l	45.442	23.703	1.92	0.95	RNA	40.00
6	Aeromonas K(-) U1	13/03/2021 11:04	9732.1	ng/ $\mu$ l	243.303	125.654	1.94	1.17	RNA	40.00
7	Aeromonas K(-) U2	13/03/2021 11:03	12879.1	ng/ $\mu$ l	321.977	178.218	1.81	1.38	RNA	40.00
8	Aeromonas K(+) L1	13/03/2021 11:06	11636.9	ng/ $\mu$ l	290.922	165.893	1.75	0.87	RNA	40.00
9	Aeromonas K(+) L2	13/03/2021 11:07	8429.0	ng/ $\mu$ l	210.725	108.640	1.94	1.02	RNA	40.00
10	Aeromonas K(+) U1	13/03/2021 11:04	4393.3	ng/ $\mu$ l	109.832	62.423	1.76	1.17	RNA	40.00
11	Aeromonas K(+) U2	13/03/2021 11:05	7518.8	ng/ $\mu$ l	187.970	96.207	1.95	1.12	RNA	40.00
12	Aeromonas A L1	13/03/2021 10:53	8876.1	ng/ $\mu$ l	221.904	123.604	1.80	0.91	RNA	40.00
13	Aeromonas A L2	13/03/2021 10:52	12378.3	ng/ $\mu$ l	309.458	197.511	1.57	1.11	RNA	40.00
14	Aeromonas A U1	13/03/2021 10:54	8886.8	ng/ $\mu$ l	222.169	121.933	1.82	1.53	RNA	40.00
15	Aeromonas A U2	13/03/2021 10:54	8937.9	ng/ $\mu$ l	223.446	121.395	1.84	1.77	RNA	40.00
16	Aeromonas B L1	13/03/2021 10:57	4582.0	ng/ $\mu$ l	114.549	68.741	1.67	1.52	RNA	40.00
17	Aeromonas B L2	13/03/2021 10:57	12817.3	ng/ $\mu$ l	320.434	191.718	1.67	1.66	RNA	40.00
18	Aeromonas B U1	13/03/2021 10:55	3643.5	ng/ $\mu$ l	91.088	51.251	1.78	1.29	RNA	40.00
19	Aeromonas B U2	13/03/2021 10:56	8766.5	ng/ $\mu$ l	219.162	120.175	1.82	1.76	RNA	40.00
20	Aeromonas C L1	13/03/2021 10:58	7962.2	ng/ $\mu$ l	188.054	109.381	1.82	1.69	RNA	40.00
21	Aeromonas C L2	13/03/2021 10:59	3002.2	ng/ $\mu$ l	45.055	41.739	1.80	0.88	RNA	40.00
22	Aeromonas C U1	13/03/2021 11:00	3776.3	ng/ $\mu$ l	94.406	53.169	1.78	0.87	RNA	40.00
23	Aeromonas C U2	13/03/2021 11:01	2150.2	ng/ $\mu$ l	53.755	30.025	1.79	0.89	RNA	40.00
24	Aeromonas D L1	13/03/2021 11:01	3451.4	ng/ $\mu$ l	86.284	46.973	1.84	1.57	RNA	40.00
25	Aeromonas D L2	13/03/2021 11:02	13158.4	ng/ $\mu$ l	328.959	223.394	1.47	1.17	RNA	40.00
26	Aeromonas D U1	13/03/2021 11:02	10091.4	ng/ $\mu$ l	252.284	144.673	1.74	1.45	RNA	40.00
27	Aeromonas D U2	13/03/2021 11:08	7939.9	ng/ $\mu$ l	198.498	110.777	1.79	1.73	RNA	40.00

Lampiran 6. Hasil Uji Kemurnian dan Konsentrasi cDNA

No.	Sample ID	Date and Time	Nucleic Acid	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Constant	Cursor abs.
1	Myxobolus K(+)	27/04/2021 11:53	1075.69	32.597	16.832	1.94	2.41	33.00	230
2	Myxobolus K(-)1	27/04/2021 11:54	889.15	26.853	13.797	1.95	2.46	33.00	230
3	Myxobolus K(-)2	27/04/2021 11:55	864.48	26.196	13.469	1.94	2.43	33.00	230
4	Aeromonas K(-) L1	27/04/2021 11:55	830.71	25.173	12.888	1.95	2.38	33.00	230
5	Aeromonas K(-) L2	27/04/2021 11:56	826.54	25.047	12.732	1.97	2.29	33.00	230
6	Aeromonas K(-) U1	27/04/2021 11:57	812.76	24.629	12.597	1.96	2.35	33.00	230
7	Aeromonas K(-) U2	27/04/2021 11:57	782.41	23.709	12.074	1.96	2.38	33.00	230
8	Aeromonas K(+) L1	27/04/2021 11:58	800.54	24.259	12.383	1.96	2.18	33.00	230
9	Aeromonas K(+) L2	27/04/2021 11:59	102.19	3.097	1.590	1.95	1.67	33.00	230
10	Aeromonas K(+) U1	27/04/2021 11:59	940.39	28.497	14.564	1.96	2.39	33.00	230
11	Aeromonas K(+) U2	27/04/2021 12:00	863.83	26.177	13.416	1.95	2.34	33.00	230
12	Aeromonas A L1	27/04/2021 12:00	843.99	25.575	13.165	1.94	2.31	33.00	230
13	Aeromonas A L2	27/04/2021 12:01	892.16	27.035	13.900	1.94	2.43	33.00	230
14	Aeromonas A U1	27/04/2021 12:02	960.69	29.112	15.013	1.94	2.43	33.00	230
15	Aeromonas A U2	27/04/2021 12:02	781.14	23.671	12.173	1.94	2.45	33.00	230
16	Aeromonas B L1	27/04/2021 12:03	847.40	25.679	13.192	1.95	2.44	33.00	230
17	Aeromonas B L2	27/04/2021 12:03	845.50	25.621	13.228	1.94	2.39	33.00	230
18	Aeromonas B U1	27/04/2021 12:04	854.85	25.904	13.380	1.94	2.39	33.00	230
19	Aeromonas B U2	27/04/2021 12:05	759.17	23.005	11.879	1.94	2.41	33.00	230
20	Aeromonas C L1	27/04/2021 12:06	980.60	29.715	15.354	1.94	2.43	33.00	230
21	Aeromonas C L2	27/04/2021 12:07	814.48	24.681	12.620	1.96	2.30	33.00	230
22	Aeromonas C U1	27/04/2021 12:07	572.66	17.535	8.841	1.96	2.18	33.00	230
23	Aeromonas C U2	27/04/2021 12:08	908.54	27.531	14.115	1.95	2.26	33.00	230
24	Aeromonas D L1	27/04/2021 12:09	803.72	24.355	12.452	1.96	2.45	33.00	230
25	Aeromonas D L2	27/04/2021 12:09	1083.86	32.844	17.021	1.93	2.40	33.00	230
26	Aeromonas D U1	27/04/2021 12:10	729.08	22.093	11.301	1.95	2.33	33.00	230
27	Aeromonas D U2	27/04/2021 12:10	746.43	22.619	11.538	1.96	2.43	33.00	230



Lampiran 7. Hasil Uji RT-qPCR Gen IL-1 $\beta$ 

Sampel	Cq	Cq Std. Dev	dCT	ddCT	Fold Change
K+L1	25,5974296	0.000	-8,801168970	-1,840932526	3,58242
K+L2	24,5847775	0.000	-9,661431377	-2,701194933	6,50340
K+U1	25,3049110	0.000	-9,780389313	-2,820152869	7,06237
K+U2	23,9660073	0.000	-10,05280239	-3,092565945	8,53012
K-L1	27,4779674	0.000	-8,76749768	-1,807261236	3,49977
K-L2	33,1591272	0.000	-2,377913347	4,582323097	0,04174
K-U1	26,5932621	0.000	-7,914666076	-0,954429632	1,93781
K-U2	28,0005397	0.000	-6,652699765	0,307536679	0,80802
AL1	33,8758554	0.000	-1,400726356	5,559510088	0,02120
AL2	33,1591272	0.000	-1,377595060	5,582641384	0,02087
AU1	32,1942722	0.000	-4,031681024	2,928555420	0,13135
AU2	32,2485383	0.000	-2,377103131	4,583133313	0,04172
BL1	27,4110827	0.000	-6,690923621	0,269312823	0,82971
BL2	30,7215754	0.000	-4,673468043	2,286768401	0,20493
BU1	26,0446747	0.000	-8,138072932	-1,177836488	2,26237
BU2	30,1410646	0.000	-4,039385847	2,920850597	0,13205
CL1	32,9257711	0.000	-0,977657212	5,982579232	0,01581
CL2	28,1215021	0.000	-5,769212845	1,191023599	0,43799
CU1	31,9489518	0.000	-2,919818934	4,040417509	0,06077
CU2	30,0053491	0.000	-5,279618874	1,680617570	0,31195
DL1	29,4830696	0.000	-4,693890261	2,266346183	0,20786
DL2	34,9737824	0.000	0,827504189	7,787740633	0,00453
DU1	32,2031463	0.000	-2,852303735	4,107932709	0,05799
DU2	28,9175998	0.000	-4,571147853	2,389088591	0,19090

Lampiran 8. Hasil Uji RT-qPCR Gen TNF- $\alpha$ 

Sampel	Cq	Cq Std. Dev	dCT	ddCT	Fold Change
K+L1	30,00747446	0.000	-4,391124075	0,787133244	0,57949
K+L2	28,61204423	0.000	-5,634164654	-0,455907335	1,37165
K+U1	27,04816042	0.000	-8,037139858	-2,858882539	7,25453
K+U2	27,53362885	0.000	-6,485180813	-1,306923495	2,47413
K-L1	27,35893446	0.000	-8,886530615	-3,708273297	13,07078
K-L2	29,34707141	0.000	-6,189969176	-1,011711858	2,01630
K-U1	33,15912724	0.000	-1,34880098	3,829456338	0,07034
K-U2	28,62164465	0.000	-6,031594771	-0,853337452	1,80668
AL1	28,8376483	0.000	-6,438933459	-1,260676141	2,39608
AL2	34,12850492	0.000	-0,408217379	4,770039939	0,03665
AU1	36,70455381	0.000	0,478600603	5,656857921	0,01982
AU2	32,65675566	0.000	-1,968885812	3,209371507	0,10811
BL1	32,53523383	0.000	-1,566772505	3,611484813	0,08182
BL2	31,78017879	0.000	-3,614864698	1,56339262	0,33835
BU1	34,29755882	0.000	0,114811142	5,29306846	0,02551
BU2	29,9623573	0.000	-4,218093195	0,960164124	0,51400
CL1	33,56853552	0.000	-0,334892795	4,843364524	0,03483
CL2	32,4831366	0.000	-1,407578312	3,770679007	0,07327
CU1	31,22599152	0.000	-3,642779241	1,535478078	0,34497
CU2	33,15912724	0.000	-2,125840724	3,052416595	0,12054
DL1	31,47054423	0.000	-2,706415602	2,471841716	0,18026
DL2	36,00581623	0.000	1,859537996	7,037795314	0,00761
DU1	33,37316075	0.000	-1,682289331	3,495967988	0,08864
DU2	31,67842398	0.000	-1,810323699	3,36793362	0,09686



### Lampiran 9. Data SPSS Survival Rate (SR)

#### Oneway

95% Confidence Interval for Mean								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
K+	3	1.00002	.00000	.00000	10.0000	100.000	100.00	100.00
K-	3	33.3333	5.77350	3.33333	18.9912	47.6755	30.00	40.00
A	3	46.6667	5.77350	3.33333	32.3245	61.0088	40.00	50.00
B	3	93.3333	5.77350	3.33333	78.9912	107.675	90.00	100.00
C	3	73.3333	5.77350	3.33333	58.9912	87.6755	70.00	80.00
D	3	56.6667	5.77350	3.33333	42.3245	71.0088	50.00	60.00
Total	18	67.2222	25.15962	5.93018	54.7106	79.7338	30.00	100.00

#### Test Of Homogeneity Of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.200	5	12	.046

Nilai Sig = 0,046,  $\alpha > 0,05$ , Sehingga data normal

#### Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10427.778	5	2085.556	75.080	.000**
Within Groups	333.333	12	27.778		
Total	10761.111	17			

Keterangan : \*\*berbeda sangat nyata (sig<0.01)

#### Post Hoc Test

##### Homogeneous Subsets

Subset for alpha = 0.05						
	Perlakuan	N	1	2	3	4
Turkey HSD <sup>a</sup>	K+	3	33.3333			
	A	3	46.6667	46.6667		
	D	3		56.6667		
	C	3			73.3333	
	B	3				93.3333
	K-	3				1.00002
	Sig.		.077	.257	1.000	.643